

УДК 582.26/551.46.09:628.5:577.1 (262.5)

Ф. П. Ткаченко, канд. біол наук, доц., **Ю. А. Ситникова**, студ.,
О. Б. Куцин, асист.

Одеський національний університет, кафедра ботаніки,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

СТАН ЕЛЕМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ВОДРОСТЕЙ ІЗ РІЗНИХ ЗА СТУПЕНЕМ ЗАБРУДНЕННЯ РАЙОНІВ ЧОРНОГО МОРЯ

Проведено порівняльне дослідження деяких показників антиоксидантної системи клітин водоростей *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. (Rhodophyta) і *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. (Chlorophyta): вмісту ТБК-активних речовин, токоферолів, глутатіону відновленого (GSH), активності глутатіонредуктази (GR). Визначено вміст важких металів (ВМ) в сланях даних видів водоростей із різних за ступенем забруднення районів Одеської затоки Чорного моря. Показана взаємозалежність між вмістом ВМ і ТБК-активних речовин у клітинах водоростей. У досліджених водоростей виявлені видові відмінності вмісту GSH, токоферолів і рівня активності GR.

Ключові слова: ВМ, перекисне окиснення ліпідів, токофероли, глутатіон відновлений, глутатіонредуктаза, водорості.

Основною екологічною проблемою Чорного моря є його евтрофікація і забруднення прибережних акваторій (шельфу) різними поліютатами: нафтою і нафтопродуктами, детергентами, ВМ, хлорорганічними сполуками тощо [1]. Токсичний вплив забруднюючих речовин на живі організми призводить їх до стресового стану [2].

Під впливом забруднювачів у клітинах гідробіонтів посилюється утворення метаболічно активних вільних радикалів, які викликають пошкодження компонентів клітин. Такий стан називають окислювальним стресом [3]. Для запобігання його виникнення в клітинах існують антиоксидантні (АО) системи як ензимної, так і неензимної природи [4, 5].

Праць, присвячених АО системі водоростей, відомо небагато [2, 6–9]. Встановлено, що у водоростей АО активність проявляє група біополімерів: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза. Крім того, важливу роль в АО захисті клітин відіграють вітаміни (А, С, Е) і глутатіон [6, 10]. Вважається, що реакція АО системи клітин гідробіонтів на різні види забруднення є універсальною, і її показники можуть використовуватися для контролю якості водного середовища [11]. Серед чорноморських водоростей-макрофітів біоіндикаторами загального забруднення водного середовища запропоновані *Ceramium rubrum* і *Enteromorpha intestinalis*. Про рівень імпаکتності акваторій судять за рівнем перекисного окиснення ліпідів [8, 9] в клітинах досліджуваних водоростей.

Незважаючи на те, що АО системи клітин рослин вивчені досить добре [7, 10 і ін.], все ж залишається не дослідженим питання про активність глутатіонредуктази як термінального ферменту в циклі глутатіону [5]. Мало відомо і про роль токоферолів в АО захисті клітин водоростей.

Актуальність досліджень АО систем клітин водоростей викликана їх важливою роллю в реалізації адаптивних можливостей даних гідробіонтів [12] в умовах забруднення водного середовища [1], що має пряме відношення до скорочення біорізноманітності деяких районів Чорного моря.

Метою даного дослідження є порівняльне вивчення ряду параметрів АО систем у двох видів макроводоростей (*C. rubrum* і *E. intestinalis*) із різних за ступенем забруднення районів моря, а також з'ясування наявності взаємозв'язку між рівнем вільнорадикального окиснення і акумуляцією в клітинах водоростей іонів ВМ (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}).

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконані на двох видах чорноморських водоростей: *C. rubrum* (Rhodophyta) і *E. intestinalis* (Chlorophyta). Зразки водоростей були зібрані в серпні 2001 р. у трьох різних за ступенем забруднення районах Одеської затоки: у торговельному порту, на біостанції ОНУ і Дачі Ковалевського. Водорості відбирали на горизонтальних поверхнях бетонних хвилеломів на глибині 0,3–0,5 м.

Слані водоростей розтирали вручну за допомогою скляного гомогенізатора Поттера, потім гомогенат центрифугували при 3000 об. хв.⁻¹ (рефрижераторна центрифуга ЦЛР-3) протягом 15 хв. Отриманий супернатант розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:3.

2 мл розведеного екстракту змішували з 3 мл осаджуючого реактиву [13] і знову центрифугували. В надосадовій рідині спектрофотометрично (спектрофотометр Spеcol 11) за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою визначали концентрацію МДА [14], а за допомогою реактиву Елмана (дитіобіснітробензойна кислота) — вміст GSH [15]. Загальний вміст токоферолів визначали за допомогою реакції з концентрованою азотною кислотою [14]. Вміст досліджуваних речовин розраховували в мкмоль. мг⁻¹ білка. Активність GR визначали спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-26) по зменшенню оптичної густини при довжині хвилі 340 нм [7]. Реакційна суміш об'ємом 2 мл містила 0,05 М трис-НСl буфер, 0,2 ммоль NADPH, 1 ммоль глутатіону окисленого (GSSG) і водоростевий гомогенат. Реакцію проводили при кімнатній температурі протягом 3 хв. Контрольне середовище містило ті ж компоненти, крім GSSG.

Вміст білка визначали за методом Лоурі [15].

Визначення вмісту ВМ (Cd, Pb, Cu, Zn) у сланях водоростей проводили на атомно-абсорбційному спектрофотометрі "Varian-800" (США) з графітовою атомізацією [16].

Результати досліджень представлені середніми величинами і їх середніми похибками ($M \pm m$). Повторюванність вимірів чотирикратна. Отримані цифрові дані опрацьовано статистично [17].

Результати досліджень і їх обговорення

Як відомо, малі дози ВМ необхідні для рослин як мікроелементи. В той же час їх надмірна кількість у водному середовищі призводить до порушення бар'єрних функцій плазматичних мембран і до значного накопичення ВМ в клітинах водоростей [12]. Під впливом ВМ в клітинах порушуються різноманітні фізіолого-біохімічні процеси [2].

Дані про вміст ВМ в сланях досліджуваних видів водоростей показали помітну різницю між трьома районами Одеської затоки. Так, в районі торговельного порту вміст досліджуваних ВМ в клітинах водоростей набагато перевищував аналогічні показники у двох інших районах затоки: Cd було більше приблизно в 2 рази; Pb — в 38–67; Cu — в 2–4 і Zn — в 5–6 разів ($P \geq 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст важких металів ($\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ сухої речовини) в сланях водоростей *Ceramium rubrum* (1) і *Enteromorpha intestinalis* (2) із різних акваторій Одеської затоки

Досліджувані акваторії	Cd		Pb		Cu		Zn	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Торговельний порт	0,29 $\pm 0,01$	0,20 $\pm 0,01$	117,00 $\pm 6,00$	27,50± 1,40	21,90± 0,65	15,35±0, 96	125,00 $\pm 6,00$	58,30 $\pm 2,90$
Дача Ковалевського	0,16 $\pm 0,01$	0,08 $\pm 0,00$	3,12 $\pm 0,15$	1,30 $\pm 0,06$	10,50± 0,31	6,96 $\pm 0,21$	24,50 $\pm 1,20$	35,30 $\pm 1,80$
Біостанція ОНУ	0,20 $\pm 0,01$	0,14 $\pm 0,01$	1,74 $\pm 0,01$	1,01 $\pm 0,05$	6,00 $\pm 0,18$	7,78 $\pm 0,23$	21,10 $\pm 1,00$	22,30 $\pm 1,00$

Максимальне накопичення ВМ в сланях водоростей, які зростали в районі порту, на нашу думку, пов'язане з забрудненням даної акваторії цими поліюгантами в результаті інтенсивного руху суден і вимивання металів з пофарбованих поверхней їх днищ [18], а також викидів значної кількості продуктів згорання дизельного палива (суднами і портовими тягачами).

Середнє положення за рівнем накопичення ВМ займають водорості, які зростають в районі Дача Ковалевського. Ця акваторія забруднюється скиданням слабо очищених каналізаційних вод (включаючи промислові викиди і змиви опадів з вулиць міста) з очисної станції "Південна" [19].

Найменший вміст ВМ відзначено у сланях водоростей району біостанції ОНУ (табл. 1). Біостанція ОНУ рівновіддалена від вище зга-

даних джерел забруднення, хоч залежно від стійно-нагінної циркуляції водних мас і напрямку вздовжберегових течій може певною мірою зазнавати їх впливу. Крім того, поблизу біостанції знаходиться скид колектора дренажних вод.

Із двох досліджуваних видів водоростей більший вміст ВМ виявлено у складі *S. rubrum*. Це пояснюється властивістю фікоколоїдів червоних водоростей утворювати комплексні сполуки з іонами металів, що забезпечує значно більший (порівняно з зеленими водоростями) рівень поглинання цих металів і утримування їх у сланях [13]. Відомо також [21], що сорбційні властивості по відношенню до іонів ВМ проявляють і білки водоростей. Враховуючи високу токсичність ВМ [12, 2] і високий рівень їх накопичення в клітинах *S. rubrum*, можна припустити, що це, очевидно, є однією з причин більш високої чутливості червоних водоростей до даного виду забруднення. З іншого боку, підвищена біоаккумуляційна здатність *S. rubrum* дозволяє розглядати цю водорість як більш чутливий індикатор забруднення водного середовища ВМ і вказує на можливість використання даного виду водоростей як ефективного біосорбента.

Нами встановлено, що рівень перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинах досліджуваних видів водоростей-макрофітів (за вмістом кінцевих ТБК-активних речовин) помітно варіює в різних районах затоки. У водоростей, що зростали в районі порту, ступінь окиснення ліпідних компонентів клітин був найвищим, про що свідчить більш високий вміст ТБК-активних речовин у їх сланях (табл. 2).

Таблиця 2

Показники антиоксидантної системи в сланях водоростей *Ceramium rubrum* (1) і *Enteromorpha intestinalis* (2) в різних акваторіях Одеської затоки

Досліджувані акваторії	Вміст ТБК-активних продуктів (мкмоль мг ⁻¹ білка)		Вміст токоферолів (мкг мг ⁻¹ білка)		Вміст GSH (мкмоль мг ⁻¹ білка)		Активність GR (мкмоль НАДФ хв. ⁻¹ мг ⁻¹ білка)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Торговельний порт	29,24 ±0,44	10,24 ±0,34	0,45 ±0,05	0,16 ±0,03	0,87 ±0,05	1,49 ±0,07	9,87 ±0,91	58,68 ±9,20
Дача Ковалевського	11,20 ±1,20	6,44 ±1,39	0,44 ±0,07	0,17 ±0,02	0,90 ±0,07	0,97 ±0,35	6,70 ±0,60	28,48 ±9,17
Біостанція ОНУ	6,40 ±1,41	5,32 ±1,38	0,50 ±0,05	0,18 ±0,02	0,49 ±0,01	1,72 ±0,24	9,81 ±0,50	54,39 ±9,35

Таким чином, підвищений вміст ТБК-активних речовин у клітинах водоростей із району торговельного порту прямо пропорційно пов'язаний з високим рівнем накопичення в їх сланях іонів ВМ.

Максимальне накопичення ВМ характерне для *S. rubrum*, і, можливо, тому цьому виду властиві більш активні вільно-радикальні процеси. Кількість ТБК-активних продуктів у *S. rubrum*, зібраного в районі

порту, в 2,9 раза більша, ніж у *E. intestinalis* ($P < 0,001$). У *C. rubrum* із району біостанції ОНУ також спостерігається досить високий рівень ПОЛ, але в даному випадку накопичення ВМ в їх сланях є мінімальним. В цілому, рівень ПОЛ у *C. rubrum* є в 1,8–5 разів вищим, ніж у *E. intestinalis* ($P < 0,01-0,001$).

Співставлення загального вмісту токоферолів у досліджуваних видів водоростей показує, що у слані *E. intestinalis* його в 2,6–2,9 рази менше, ніж у *C. rubrum* ($P < 0,001$).

Аналіз вмісту відновленого глутатіону і активності GSH-залежного ферменту GR дає додаткову інформацію про рівень окиснювального навантаження в сланях досліджуваних водоростей. Максимальна активність GR і більш високий вміст GSH виявлено у *E. intestinalis*, а мінімальна — у *C. rubrum*. Можна припустити, що використання GSH в антиоксидантному захисті у *E. intestinalis* здійснюється, очевидно, з переважанням процесів його ресинтезу, а у *C. rubrum* — шляхом інтенсивного використання даного антиоксиданту в окисно-відновлювальних процесах. За деякими даними [20], такий механізм метаболізму GSH у *C. rubrum* є більш вразливим, бо в умовах хронічного забруднення ресурс глутатіону в клітинах водорості швидко вичерпується. Це може призвести до порушення функціонування глутатіонзалежної антипероксидної системи у цих клітинах [10]. Ці закономірності, можливо, обумовлюють більш високу інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення в клітинах *C. rubrum* і значно меншу — в клітинах *E. intestinalis*. Можливо, здатність *E. intestinalis* підтримувати в клітинах достатньо високий рівень антиоксиданту GSH, забезпечує підвищену толерантність цієї водорості до різного роду забруднень водного середовища. Цим, можливо, пояснюється і те, що *E. intestinalis* є космополітом, евригаліним і в певній мірі еврitherмним видом.

Таким чином, проведені дослідження показують, що в умовах забруднення водного середовища водорості проявляють видову специфічність стратегії АО захисту. У *E. intestinalis* АО система є, очевидно, більш ефективною. Плануючи використання водоростей-макрофітів як об'єктів марікультури, слід зважати і на особливості їх АО систем в конкретних екологічних умовах.

Висновки

1. Максимальне накопичення важких металів (Cu, Cd, Zn, Pb) в клітинах водоростей спостерігається у найбільш забрудненому районі Одеської затоки — акваторії торговельного порту.
2. В клітинах *Ceramium rubrum* реєструється більш високий рівень акумуляції важких металів, ніж у *Enteromorpha intestinalis*.
3. Вміст ТБК-активних речовин у досліджуваних видів водоростей прямо пропорційний рівню накопичення в їх сланях важких металів.

4. Між *Enteromorpha intestinalis* і *Ceramium rubrum* виявлено видові відмінності вмісту глутатіону відновленого, токоферолів і рівня активності глутатіонредуктази.

Література

1. Plyin Y. P., Klimenko N. P., Ryabinin A. I., Shibaeva S. A. The Black Sea coastal waters pollution in the period of 1999-2000 уу. on monitoring materials of Ukrainian marine hydrometeorological units // The Black Sea ecological problems: Col. scient. art. — Odessa: SCSEIO, 2000. — P. 91–95.
2. Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R. et al. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts // Arch. of Environ. Contam. and Toxic. — 2001. — V. 40. — P. 18–24.
3. Грановская Л. А., Широкова Е. А., Телитченко Л. А. и др. Адаптационные изменения структурно-функциональных характеристик *Chlorella pyrenoidosa* Chick (Chlorophyta) при воздействии ультрафиолетового облучения // Альгология. — 1993. — Т. 3, № 1. — С. 41–48.
4. Grace S. C., Logan B. A. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species // Plant Physiol. — 1996. — V. 112. — P. 1631–1640.
5. Walker M. A., McKersie B. D. Role of ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato // J. Plant Physiol. — 1993. — V. 141. — P. 234–239.
6. Гусарова И. С., Голотин В. Г., Гоненко В. А. и др. Антиоксидантная активность липидов водорослей-макрофитов залива Петра Великого (Японское море) // Растит. ресурсы. — 1988. — 24, вып. 1. — С. 104–106.
7. Овсянникова Т. Н., Миронова Н. Г., Заболотный В. Н. и др. Состав и антиоксидантная активность комплекса биополимеров из *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. // Альгология. — 1998. — Т. 8, № 1. — С. 74–81.
8. Шахматова О. А., Парчевская Д. С. Активность каталазы и контроль качества воды // Альгология. — 2000. — Т. 10, № 3. — С. 355–361.
9. Шахматова О. А., Парчевская Д. С. Перекисное окисление липидов некоторых видов морских водорослей и качество воды // Мат. XI з'їзду Укр. бот. тов-ва: Тез. доп., Харків, 25–27 вересня 2001 р. — Харків, 2001. — С. 431–432.
10. Гришко В. Н., Сыщиков Д. В. Влияние фтористого водорода на активность ферментов цикла глутатиона в листьях некоторых древесных растений // Доп. НАН України. — 2000. — № 12. — С. 179–184.
11. Шахматова О. А. Активность антиоксидантной системы личинок рыб как показатель качества морской среды // Экология моря. — 2002. — Вып. 59. — С. 48–50.
12. Пасичная Е. А. Токсичность меди для гидрофитов: аккумуляция, влияние на фотосинтез, дыхание, пигментную систему (обзор) // Гидробиол. журн. — 2001. — Т. 37, № 3. — С. 93–106.
13. Тропин И. В., Золотухина Е. Ю. Динамика аккумуляции тяжелых металлов у бурых и красных водорослей // Физиол. раст. — 1994. — Т. 41, № 2. — С. 305–312.
14. Горечковский А. И. Методы клинической биохимии. — Одесса: Астропринт, 1995. — 398 с.
15. *Современные методы биохимии* / Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 276 с.
16. IAEA. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. Refer. UNEP / FAO / IOC. — М.: М.Р.С., 1995. — № 65. — 46 р.
17. Шмидт В. М. Математические методы в ботанике. — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1984. — 287 с.
18. Саут Р., Уиттик А. Основы альгологии. — М.: Мир. — 1990. — 595 с.
19. Гончаров А. Ю. Гидрохимический режим и первичная продукция фитопланктона в районе аварийного выпуска сточных вод в Одесском заливе // Экология моря. — 2001. — Вып. 58. — С. 64–68.

20. Александрова О. Л., Солдатов А. А., Головина И. В. Особенности глутатионпероксидной системы в тканях двух цветовых морф черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. — 2001. — Вып. 58. — С. 22–26.
21. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / Методы биохим. исслед. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — С. 183–186.

Ф. П. Ткаченко, Ю. А. Ситникова, Е. Б. Куцын

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, каф. ботаники,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

СОСТОЯНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ ИЗ РАЗНЫХ ПО СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ РАЙОНОВ ЧЕРНОГО МОРЯ

Резюме

Проведено сравнительное исследование некоторых показателей антиоксидантной системы клеток водоростей *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. (Rhodophyta) и *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. (Chlorophyta): содержание ТБК-активных веществ, токоферолов, глутатиона восстановленного (GSH), активность глутатионредуктазы (GR). Определено содержание тяжелых металлов (ТМ) в талломах водоростей, собранных в разных по степени загрязнения районах Одесского залива. Отмечена взаимосвязь между содержанием ТМ и ТБК-активных веществ в талломах водоростей. У исследованных видов водоростей выявлены видовые различия в содержании GSH, токоферолов и уровне активности GR.

Ключевые слова: ТМ, накопление, перекисное окисление липидов, токоферолы, GSH, GR, водоросли.

F. P. Tkachenko, Y. A. Sitnikova, E. B. Kutsin

Odessa National University, Department of Botany,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

STATE OF ELEMENTS OF ANTIOXYDANT SYSTEM OF SEAWEEDS FROM THE BLACK SEA REGIONS WITH DIFFERENT LEVEL OF POLLUTION

Summary

The comparative research of some antioxidant indexes (contents of TBA-active products, glutathione, tocopherols and glutathione reductase activity) of seaweeds *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. (Rhodophyta) and *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. (Chlorophyta) was made. Contents of heavy metals (HM) in thallus of seaweeds, which were collected in different by rate of pollution areas of Odessa Bay of the Black Sea were determined. It was shown the connection between contents of HM and TBA-active products in thallus of algae. The species differences of antioxidant cell protection of algae were determined: the levels of GSH, tocopherols and GR-activities.

Keywords: heavy metals, accumulation, 2-thiobarbituric acid reactive products, tocopherols, GSH, GR, seaweeds.