

Ф. П. ТКАЧЕНКО, Ю. А. СИТНИКОВА, Е. Б. КУЦЫН

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

Проведено сравнительное исследование некоторых показателей антиоксидантной системы клеток водорослей *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 данных видов водорослей из разных по степени загрязнения районов Одесского залива Черного моря. Показана взаимосвязь между содержанием ТМ и ТБК-активных веществ в клетках водорослей. В исследованных водорослях выявлены видовые отличия в содержании GSH, токоферолов и уровне активности GR.

Основной экологической проблемой Черного моря является загрязнение его прибрежных акваторий (шельфа) различными поллютантами: нефтью и нефтепродуктами, детергентами, тяжелыми металлами (ТМ), хлорорганическими соединениями и др. [19], что, как известно [20], является стрессовым фактором для гидробионтов. Под влиянием загрязнителей в клетках живых организмов усиливается образование метаболически активных свободных радикалов, вызывающих повреждение компонентов клеток. Такое состояние называется оксидантным стрессом [4]. Для предотвращения его возникновения в клетках существуют антиоксидантные (АО) системы как энзиматической, так и неэнзиматической природы [17, 21].

Работ, посвященных АО системе водорослей, известно немного [6, 9, 14, 15, 20]. Установлено, что у водорослей АО активностью обладает группа биополимеров: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза. Большую роль в этом процессе играют витамины (А, С, Е) и глутатион [5, 6]. Считается, что реакция АО системы клеток гидробионтов на различные виды загрязнения является универсальной, и ее показатели могут использоваться для контроля качества водной среды [13].

Среди черноморских водорослей-макрофитов в качестве биоиндикаторов предложены *Ceramium rubrum* и *Enteromorpha intestinalis*, а их биомаркерами – уровень перекисного окисления липидов [14, 15]. В то же время, остается не исследованной реакция водорослевых тест-объектов по некоторым другим параметрам их АО системы. В частности, не выяснена роль в этом процессе глутатионредуктазы, как терминального фермента в цикле глутатиона [21] и витамина Е.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение ряда параметров АО комплекса у двух видов макроводорослей в разных по степени загрязнения районах моря, а также выяснение возможной взаимосвязи между уровнем свободнорадикального окисления и аккумуляцией в клетках ионов ТМ (Cu, Cd, Zn, Pb).

Материал и методы. Исследования проведены на двух видах черноморских водорослей: *Ceramium rubrum* (Rhodophyta) и *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta). Образцы водорослей были собраны в августе 2001 г. в трех разных по степени загрязнения районах Одесского залива: торговый порт, биостанция ОНУ и Дача Ковалевского.

Талломы водорослей гомогенизировали вручную с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера, затем гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин⁻¹ (рефрижераторная центрифуга ЦЛР-3) в течение 15 мин. Полученный супернатант разводили в четыре раза дистиллированной водой. 2 мл разведенного экстракта смешивали с 3 мл осаждающего реактива [11] и снова центрифугировали. В надосадочной жидкости спектрофотометрически (спектрофотометр Specol 11) при помощи реакции с тиобарбитуровой кислотой определяли концентрацию МДА [3], а при помощи реактива Элмана (дитиобиснитробензойная кислота) – содержание GSH [11]. Общее содержание токоферолов определяли на основе реакции с концентрированной азотной кислотой [3]. Содержание названных параметров представлено в мкМ мг⁻¹ белка. Активность GR определяли спек-

© Ф. П. Ткаченко, Ю. А. Ситникова, Е. Б. Куцын, 2004

трофотометрически (спектрофотометр СФ–26) по уменьшению оптической плотности при длине волны, равной 340 нм. Реакционная среда: 2 мл, содержащие 0,05 М трис-HCl буфер, 0,2 мМ NADPH, 1 мМ глутатиона окисленного (GSSG) и водорослевый гомогенат. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 3 мин. Контрольная среда содержала те же компоненты, кроме GSSG. За единицу активности GR принимали такое количество белка, которое катализировало 1 мМ NADPH [9].

Содержание белка определяли по методу Лоури [11].

Определение содержания тяжелых металлов (Cd, Pb, Cu, Zn) в талломах водорослей проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре Varian–800 (США) с графитовой атомизацией [18].

Результаты исследований представлены средними величинами и их ошибкой ($M \pm m$). Повторность измерений четырехкратная. Полученные цифровые данные обработаны статистически [16].

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований нами установлено, что содержание ТМ в талломах водорослей отражает уровень загрязнения районов их произрастания: максимальное – в акватории торгового порта, а минимальное – в районе биостанции ОНУ (табл. 1). В районе торгового порта повышенное содержание

Таблица 1. Содержание ТМ (мг кг^{-1} сухого вещества) в талломах водорослей *Ceramium rubrum* (1) и *Enteromorpha intestinalis* (2) в разных районах Одесского залива
Table 1. Heavy metals contents (mg kg^{-1} dry weight) in thallus of algae *Ceramium rubrum* (1) and *Enteromorpha intestinalis* (2) from different areas of Odessa Bay

Районы исследования	Cd		Pb		Cu		Zn	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Торговый порт	0,29± 0,01	0,20± 0,01	117,00± 6,00	27,50± 1,40	21,90± 0,65	15,35± 0,96	125,00± 6,00	58,30± 2,90
Дача	0,16±	0,08±	3,12±	1,30±	10,50±	6,96±	24,50±	35,30±
Ковалевского	0,01	0,00	0,15	0,06	0,31	0,21	1,20	1,80
Биостанция	0,20±	0,14±	1,74±	1,01±	6,00±	7,78±	21,10±	22,30±
ОНУ	0,01	0,01	0,01	0,05	0,18	0,23	1,00	1,00

ТМ связано с интенсивным судоходством и выщелачиванием металлов с окрашенных поверхностей днищ судов [10]. Район Дачи Ковалевского загрязняется сбросом слабо очищенных канализационных вод, включающих промышленные стоки и смывы осадков с улиц города, с очистной станции “Южная” [2]. Биостанция ОНУ равноудалена от этих основных источников загрязнения, хотя в зависимости от сгонно-нагонной циркуляции водных масс и направления вдольбереговых течений, может в определенной мере испытывать их влияние. Кроме того, вблизи этого района находится сброс коллектора дренажных вод.

Из двух исследованных видов водорослей большее содержание ТМ выявлено у *C. rubrum*. Это объясняется способностью фикоколлоидов красных водорослей образовывать комплексные соединения с ионами металлов, что обеспечивает значительно большее (по сравнению с зелеными) поглощение и удержание в их талломах данных токсикантов [12]. Известно также [8], что сорбционные свойства по отношению к ионам ТМ проявляют и белковые соединения водорослей. Учитывая высокую токсичность ТМ [7, 20] и степень их накопления в клетках *C. rubrum*, можно предположить, что это, очевидно, является одной из причин большей уязвимости красных водорослей к данному виду загрязнения. С другой стороны, повышенная биоаккумулирующая способность *C. rubrum* позволяет рассматривать его как более чувствительный индикатор загрязнения водной среды ТМ и указывает на возможность использования данного вида водорослей как эффективного биосорбента.

Исследование уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках изучаемых видов водорослей-макрофитов показало, что наибольшим содержанием конечных ТБК-

активных продуктов выделяются популяции *C. rubrum* и *E. intestinalis*, обитающие в порту (табл. 2). Здесь содержание этих веществ в талломах водорослей прямо пропорционально уровню накопления в их клетках ионов ТМ.

Таблица 2. Показатели антиоксидантного комплекса в талломах водорослей *Ceramium rubrum* (1) и *Enteromorpha intestinalis* (2) в разных районах Одесского залива

Table 2. Antioxidant complex indexes in thallus of algae *Ceramium rubrum* (1) and *Enteromorpha intestinalis* (2) from different areas of Odessa Bay

Районы исследования	Содержание ТБК-активных продуктов (мкМ мг ⁻¹ белка)		Содержание токоферолов (мкг мг ⁻¹ белка)		Содержание GSH (мкМ мг ⁻¹ белка)		Активность GR (мМ НАДФ мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Торговый 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	8,68±9,20
Дача	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
Ковалевского	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
Биостанция								
ОНУ								

Максимальное содержание ТМ характерно для *C. rubrum* и, соответственно, у данного вида наиболее активны свободно-радикальные процессы. Количество ТБК-активных продуктов у *C. rubrum* из порта в 2,9 раза выше, чем у *E. intestinalis* ($P < 0,001$). У *C. rubrum* из района биостанции ОНУ также наблюдается довольно высокий уровень ПОЛ, но в данном случае накопление ТМ в его талломе – минимально и на водоросль действуют, очевидно, другие неблагоприятные факторы. В целом уровень ПОЛ у *C. rubrum* в заливе в 1,8 – 5 раз выше, чем у *E. intestinalis* ($P < 0,01 - 0,001$).

Сопоставление общего содержания токоферолов у исследуемых видов водорослей показывает, что в талломе *E. intestinalis* его в 2,6 – 2,9 раза меньше, чем у *C. rubrum* ($P < 0,001$). Очевидно, в клетках *E. intestinalis* данный антиоксидант используется для нейтрализации пероксидных радикалов более эффективно, чем у *C. rubrum*.

Анализ содержания восстановленного глутатиона и активности GSH-зависимого фермента GR дает дополнительную информацию о степени окислительной нагрузки в талломах исследуемых водорослей. Максимальная активность GR и более высокое содержание GSH отмечено у *E. intestinalis*, а минимальные – у *C. rubrum*. Можно предположить, что использование GSH в антиоксидантной защите у *E. intestinalis* осуществляется, очевидно, с преобладанием процессов его ресинтеза, а у *C. rubrum*, напротив, направлено в сторону его активного участия в окислительно-восстановительных процессах. По некоторым данным [1], такой механизм метаболизма GSH у *C. rubrum* является более уязвимым, так как в условиях стресса хронического загрязнения ресурс глутатиона истощается. Это может привести к нарушению функционирования глутатионзависимой антипероксидной системы клеток [5]. Данное явление, очевидно, обуславливает более высокую интенсивность процессов свободнорадикального окисления в клетках *C. rubrum* и значительно меньшую – у *E. intestinalis*. Возможно, способность *E. intestinalis* поддерживать в клетках достаточно высокий уровень антиоксиданта GSH, обеспечивает ее повышенную толерантность к различного рода загрязнениям водной среды. Этим же, очевидно, объясняется и то, что *E. intestinalis* является космополитом, эвригалинным и в определенной мере эвритермным видом водорослей.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что в условиях загрязнения водной среды водоросли проявляют видовую специфичность стратегии АО защиты. У *E. intestinalis* АО система является, очевидно, более эффективной. Планируя использование водорослей-макрофитов как объектов марикультуры, следует проверять особенности их АО системы в конкретных экологических условиях.

Выводы. 1. Максимальное накопление тяжелых металлов наблюдается в клетках *Ceramium rubrum*, а минимальное – у *Enteromorpha intestinalis*. **2.** Уровень ТБК-

активных веществ в исследуемых видах водорослей имеет положительную корреляцию с содержанием в их талломах тяжелых металлов. 3. Между *Enteromorpha intestinalis* и *Ceramium rubrum* выявлены видовые различия в содержании глутатиона восстановленного, токоферолов и уровне активности глутатионредуктазы.

1. 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.
2. 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.
3. Горечковский А. И. Методы клинической биохимии. – Одесса: Астропринт, 1995. – 398 с.
4. Грановская Л. А., Широкова Е. А., Телитченко Л. А., Светлова Е. Н. Адаптационные изменения структурно-функциональных характеристик *Chlorella pyrenoidosa* Chick (Chlorophyta) при воздействии ультрафиолетового облучения // Альгология. – 1993. – 3, № 1. – С. 41 - 48.
5. 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.
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. Пасичная Е. А. Токсичность меди для гидрофитов: аккумуляция, влияние на фотосинтез, дыхание, пигментную систему (обзор) // Гидробиол. журн. – 2001. – 37, № 3. – С. 93 - 106.
8. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / Методы биохим. исслед. – Л.: Изд - во ЛГУ, 1982. – С. 183 - 186.
9. Овсянникова Т. Н., Миронова Н. Г., Заболотный В. Н. и др. Состав и антиоксидантная активность комплекса биополимеров из *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. // Альгология. – 1998. – 8, № 1. – С. 74 - 81.
10. Саут Р., Уиттик А. Основы альгологии. – М.: Мир. – 1990. – 595 с.
11. Современные методы биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 276 с
12. Тропин И. В., Золотухина Е. Ю. Динамика аккумуляции тяжелых металлов у бурых и красных водорослей // Физиол. раст. – 1994. – 41, № 2. – С. 305 - 312.
13. Шахматова О. А. Активность антиоксидантной системы личинок рыб как показатель качества морской среды // Экология моря. – 2002. – Вып. 59. – С. 48 - 50.
14. Шахматова О. А., Парчевская Д. С. Активность каталазы и контроль качества воды // Альгология. – 2000. – 10, № 3. – С. 355 - 361.
15. 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.
16. Шмидт В. М. Математические методы в ботанике. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1984. – 287 с.
17. Grace S. C., Logan B. A. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species // Plant Physiol. – 1996. – 112. – P. 1631 - 1640.
18. IAEA. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. Refer. UNEP / FAO / IOC. – М.: М.Р.С., 1995. – № 65. – 46 p.
19. Ilyin Y. P., Klimenko N. P., Ryabinin A. I., Shibaeva S. A. The Black Sea coastal waters pollution in the period of 1999–2000 on monitoring materials of Ukrainian marine hydrometeorological units // The Black Sea ecological problems: Col. scient. art. – Odessa: SCSEIO, 2000. – P. 91 - 95.
20. Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R. et al. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts// Arch. Environ. Contam. Toxic. – 2001. – 40. – P. 18 - 24.
21. Walker M. A., McKersie B. D. Role of ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato // J. Plant Physiol. – 1993. – 141. – P. 234 - 239.

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
г. Одесса

Получено 26. 11. 2002,
после переработки 06.08.2003

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

Summary

The comparative analysis of some antioxidant indexes (contain 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. Heavy metals (HM) contents in thallus of seaweeds, collected in different polluted areas in Odessa Bay (the Black Sea) were determined. The connection between contents of HM and TBA-active products in thallus of algae is shown. The species differences of antioxidant cell protection of algae were determined: the levels of GSH, tocopherols and GR-activities.

ЗАМЕТКА

Черноморский краб *Pilumnus hirtellus* - новый хозяин для грегарины *Cephaloidophora rhithropanopei* Belofastova, 1994 (Eugregarinida: Cephaloidophoridae) [Black Sea crab *Pilumnus hirtellus* is the new host for the gregarine *Cephaloidophora rhithropanopei* (Eugregarinida: Cephaloidophoridae)]. При исследовании паразитофауны прибрежных ракообразных в районе Севастополя (Черное море, крымское побережье) у *Pilumnus hirtellus* L., 1758 (Decapoda: Reptantia) были обнаружены грегарины *Cephaloidophora rhithropanopei* Belofastova, 1996 (Eugregarinida: Cephaloidophoridae)], ранее отмеченные только у солоноватоводного краба *Rhithropanopeus harrisi tridentata* (Maitland, 1874) в этом же районе (Белофастова, 1996). Экстенсивность инвазии составляла 12 % (вскрыто 52 экз.), интенсивность - 3 - 15 экз. (в среднем 9). *P. hirtellus* является новым хозяином для этого вида паразитов. Большинство грегариин находилось на стадии сизигий. Сизигии каудофронтальные. Размерные характеристики (в мкм) и пропорции обнаруженных экземпляров более вариабельны, чем у экземпляров от *R. harrisi tridentata*. ПРИМИТ: TL — 140 - 157,5; LP — 17,5 - 38,5; WP — 24,5 - 35; LD — 123 - 140; WD — 24,5 - 70; LP:TL — (1,2 - 2,2) : 10; WP:WD — (4 - 7) : 10; N — 17,5 - 21; N:LD — (1,4 - 1,7) : 10; LND:LD — (4 - 5):10. САТЕЛЛИТ: TL — 125 - 192,5; LP — 17,5 - 21; WP — 24,5 - 35; LD — 107,5 - 174,5; WD — 21 - 45,5; LP:TL — (1 - 1,4) : 10; WP — (7 - 8):10; N — 10,5 - 17,5; N:LD — (0,7 - 1,6): 10; LND:LD — (5 - 8):10. Несмотря на то, что оба вида хозяев относятся к одному семейству (Xanthidae Alcoc, 1896), данная находка представляет интерес, т.к. большинство представителей Cephaloidophoridae - узкоспецифичны. Кроме того, один из хозяев (*R. harrisi tridentata*) является вселенцем в Черное море. **В. Л. Лозовский, И. П. Белофастова** (Институт биологии НАН Украины, г. Севастополь).