

УДК [582.265+582.273]:577.1

О. А. ШАХМАТОВА, Д. С. ПАРЧЕВСКАЯ

Ин-т биологии южных морей НАН Украины,
Украина 99011, Крым, Севастополь, пр. Нахимова, 2

АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВОДЫ

Показано, что активность одного из антиоксидантных ферментов – каталазы водорослей *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. и *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link может быть использована в качестве биомаркера импактности морских акваторий. Определен уровень активности каталазы, отвечающий нормальному функционированию водорослей. Установлено, что порог чувствительности активности каталазы у исследуемых водорослей для нитратов составляет 2 мкМ/л, а для нитритов – на порядок меньше.

Ключевые слова: антиоксиданты, активность каталазы, макрофиты, нитраты, нитриты, биомаркер, норма отклика, порог чувствительности.

Введение

Экологическое состояние морской среды в результате антропогенного загрязнения в настоящее время катастрофически ухудшается. Спектр веществ, загрязняющих акваторию, чрезвычайно широк. Прямое определение их крайне трудоемко и дорого. Для контроля состояния импактных зон все большее значение приобретает экологический мониторинг.

Система экологического мониторинга включает решение проблем выбора биомаркера и соответствующих ему организмов-индикаторов, а также оценку нормального состояния системы (Израэль, 1979; Федоров и др., 1980). Выбор биомаркера и организмов-индикаторов в некотором смысле является произвольным и зависит от поставленной задачи. Биомаркеры можно условно разделить на две категории: структурно-морфологические и функциональные. Структурно-морфологические параметры используются для выявления отдаленных последствий загрязнения. Нарушение функциональных характеристик системы проявляется быстрее. Преимуществом использования биохимических параметров в качестве биомаркеров является почти мгновенная их реакция на ухудшение состояния морских акваторий.

При нормальной жизнедеятельности в клетках образуются свободные радикалы – метаболитические активные соединения, нарушающие обмен веществ и ускоряющие процессы старения организма (Прайор, 1979). Образование свободных радикалов активизируется при различных стрессовых ситуациях, особенно в случае токсического воздействия. Их детоксикацию обеспечивают антиоксиданты (Winstone, Di-Giulio, 1991). Это широкая группа веществ, включающая и ферменты – супероксиддисмутазу, каталазу, пероксидазу, и низкомолекулярные вещества – витамины (в основном А и Е), каротиноиды, вещества, содержащие сульфгидрильные группы и др. Ферментом, катализирующим реакцию перевода свободных радикалов в менее токсичную перекись водорода, является супероксиддисмутаза. Обезвреживание все еще токсичной перекиси осуществляет каталаза. Она является гемсодержащим ферментом (Е.С.1.11.1.6.), локализованным в митохондриях, а также в клеточных

органеллах пероксисомах, где находятся многие оксидазы, восстанавливающие супероксидный радикал до перекиси водорода. Каталаза разлагает пероксид водорода до кислорода и воды. Этот фермент является необходимым компонентом системы защиты, которая делает возможной аэробную жизнь (Фридович, 1979). Известно изменение активности каталазы гидробионтов под действием полициклических ароматических углеводородов, полихлорбифенилов, тяжелых металлов (Livingstone, et al., 1992; 1993; Di-Giulio, et al., 1993; Peters, et al., 1994). Поэтому в качестве биомаркера нами была выбрана активность каталазы.

Целью настоящей работы является апробация метода определения активности каталазы черноморских водорослей в экологическом мониторинге для выявления наиболее импактных морских акваторий.

Материалы методы

Выбор организмов-индикаторов производился нами на основании критериев, разработанных еще в начальный период развития экологического мониторинга. Эти критерии наиболее полно сформулированы в работе Батлера с соавторами (Butler et al., 1971). Организм-индикатор должен иметь оседлый образ жизни, разумные размеры, высокую численность популяции, достаточную продолжительность жизни. Одним из главных требований является существование интервала концентраций веществ, загрязняющих акваторию, в пределах которого не наступает летальный исход. Такие пределы названы толерантными. И наконец, предлагаемый метод экологического мониторинга должен быть экономически выгодным: доступный отбор проб, непродолжительное время анализа, недорогостоящие используемые реактивы. Позднее этот перечень критериев был дополнен требованием существования зависимости уровня биомаркера от концентрации вещества, загрязняющего акваторию (Haug et al., 1974). Это требование придало экологическому мониторингу особо важного значения, так как по уровню биомаркера стало возможным количественно характеризовать состояние морской среды.

В процессе работ мы использовали метод определения каталазной активности (см. Березов, 1976), основанный на способности фермента разлагать перекись водорода на кислород и воду. Уровень активности каталазы при этом определяется по количеству разложившейся перекиси водорода в грамме сырой массы ткани в минуту и выражали в мг перекиси / (г сырой ткани • мин).

Районом исследования была избрана Севастопольская бухта (длиной 10 км), изрезанная множеством мелких бухт, по берегам которых расположены жилые массивы, предприятия города. В 80-х гг. Севастопольская бухта была перекрыта бетонным молом, поэтому имеет ограниченный водообмен. Это создало предпосылки для образования акваторий с различной степенью импактности. Нумерация станций произведена в порядке возрастания антропогенной нагрузки.

Материалом исследования служили макрофиты из различных районов Севастопольской бухты, отличающихся уровнем загрязнения. Было изучено 6 видов водорослей: *Cystoseira barbata* (Good et Wood) Ag., *Scytosiphon lomentaria* (Lyngb.) Link, *Cladophora albida* (Huds.) Kütz, *Ulva rigida* Ag., *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link., *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. (Вассер и др., 1989). Водоросли отбирали ежемесячно с марта по декабрь 1998 г. практически одновременно с отбором проб для анализа морской воды. Определение активности каталазы проводили не более чем

через час после отбора проб. Каждая точка получена усреднением 3-4 повторностей. Концентрации нитритов и нитратов в морской воде определялись стандартными методами.

Результаты и обсуждение

В таблице приведены данные, касающиеся уровня изменения активности каталазы в черноморских водорослях. Поскольку в литературе отсутствуют подобные данные, эти диапазоны можно считать некоторой оценкой их толерантных пределов. Из таблицы видно, что бурые водоросли, особенно *Scytosyphon lomentaria* (Lyngb.) Link., обладают большей активностью каталазы по сравнению с зелеными и красными. Высокие уровни показателя определяются, как правило, с наименьшей относительной ошибкой, поэтому именно *S. lomentaria* могла бы стать хорошим индикатором загрязнения. Но этот вид присутствует в бухте только в зимний период. Бурая водоросль *Cystoseira barbata* (Good et Wood) Ag. и зеленая *Ulva rigida* Ag. являются многолетними и принадлежат к ведущим видам. Но в зимний период у многолетних в море остается только слоевище. Кроме того, цистозира особенно чувствительна к загрязнению морской воды, и при длительном его воздействии она вытесняется зелеными водорослями, чаще всего ульвой. Значит, в более чистых районах отсутствует *Ulva*, а в более загрязненных – *Cystoseira*. У многолетних и однолетних форм водорослей материнское растение после плодоношения продолжает расти, а у сезонных – отмирает и разрушается (Калугина-Гутник, 1975). Поэтому сформулированным требованиям к организмам-индикаторам из исследованных нами водорослей отвечают только однолетние. Но *Cladophora albida* (Huds.) Kütz. в Севастопольской бухте является сопутствующим видом, т. е. не массовым. Поэтому в качестве организмов-индикаторов нами были выбраны зеленая водоросль *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. и красная – *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag.

Диапазон изменения активности каталазы в черноморских водорослях из различных районов Севастопольской бухты

Таксон	Диапазон изменения активности каталазы, мг H ₂ O ₂ / (г ткани • мин)
<i>Scytosyphon lomentaria</i> (Lyngb.) Link.	1,191-1,316
<i>Cystoseira barbata</i> (Good et Wood) Ag.	0,149-0,191
<i>Ulva rigida</i> Ag.	0,037-0,0567
<i>Cladophora albida</i> (Huds.) Kütz.	0,032-0,565
<i>Enteromorpha intestinalis</i> (L.) Link.	0,019-0,84
<i>Ceramium rubrum</i> (Huds.) Ag.	0,034-0,567

На рис. 1 представлена годовая динамика активности каталазы у *Enteromorpha intestinalis* (рис. 1, а) и у *Ceramium rubrum* (рис. 1, б) на четырех исследуемых станциях. Из рисунка видно, что на станции 4 активность каталазы у обоих видов водорослей значительно выше, чем на станциях 1-3. Изменяется не только уровень активности, но и форма кривых. Это свидетельствует о стрессовой ситуации в акватории станции 4, что соответствует данным о высокой импактности этой области бухты в 1998 г. (диапазон концентрации нитратов составляет 2-100 мкМ/л, а для нитритов 0,2-1 мкМ/л).

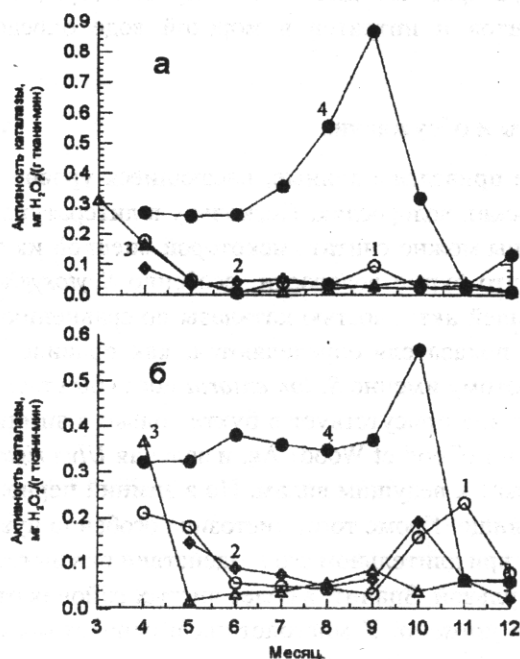


Рис. 1. Годовая динамика активности каталазы *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. (а) и *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. (б), собранных в различных районах Севастопольской бухты, отличающихся по степени импактности. Номера кривых соответствуют номерам станций.

В системе экологического мониторинга центральной проблемой является определение уровня биомаркера в организмах, обитающих в нормальных условиях – нормы отклика. Прямое определение нормы отклика стало невозможным в условиях увеличивающейся антропогенной нагрузки на прибрежные экосистемы. Было предложено норму отклика находить в гидробионтах из условно чистых акваторий (Израэль, 1979; Федоров и др., 1980). В нашем исследовании условно чистыми акваториями можно считать станции 1-3. С марта до мая значения активности каталазы в энтероморфе (рис. 1, а) резко снижаются, затем до декабря величина ее каталазной активности достаточно стабильна и составляет $0,034 \text{ мг}/(\text{г} \cdot \text{мин})$. Пользуясь выборкой значений активности каталазы в энтероморфе с мая по декабрь включительно, мы рассчитали 95 %-й доверительный интервал ее среднего значения: $0,034 \pm 0,009$ ($n=24$). Предлагается этот доверительный интервал считать оценкой нормы активности каталазы в энтероморфе. Доверительный интервал нормы для церамиума рассчитывали по выборке значений за июнь-сентябрь: $0,057 \pm 0,012$ ($n=12$) (рис. 1, б).

Сравнение рис. 1, а и 1, б показывает, что среднее значение активности каталазы, а также ее вариабельность у зеленой водоросли *E. intestinalis* заметно ниже, чем у красной *C. rubrum*. Гипотетично это можно объяснить тем, последняя обладает более чувствительным механизмом отклика на тот же градиент загрязнения. Кривые для *C. rubrum* и *E. intestinalis* отличаются тем, что значение каталазной активности у церамиума осенью опять несколько увеличивается. Повышение активности каталазы у *C. rubrum* в холодное время года можно объяснить следующими

причинами: а) влияние температуры воды, б) загрязненность акваторий, в) физиологические циклы развития. Гипотеза влияния температуры морской воды была отвергнута, так как мы не получили зависимости активности каталазы непосредственно от температуры, что не противоречит тому, что водоросли способны "настраиваться" на температуру окружающей среды (Гапочка, 1981). Загрязненность акваторий трех станций одновременно в зимнее время возможна, но маловероятна. А. А. Калугина, исследуя циклы развития водорослей, показала, что в апреле в Севастопольской бухте размножение церамииума происходит только тетраспорами, а с мая по ноябрь присутствуют одновременно тетраспоры и цистокарпы (Калугина-Гутник, 1975). Поэтому можно предположить, что в период бесполого размножения *Ceramium* присущи более высокие значения активности каталазы. Однако эта гипотеза требует дополнительных исследований.

На рис. 2 и 3 представлены зависимости активности каталазы у энтероморфы и церамииума от концентрации нитритов и нитратов в морской воде, соответственно. Все четыре кривые на двух рисунках характерны для начала кривых доза – эффект. При увеличении концентрации загрязнения водоросли в состоянии адаптироваться к условиям ухудшения качества воды только до некоторого уровня загрязнения, далее включаются механизмы защиты, т. е. повышается уровень активности каталазы. Если под адаптацией понимать "любые полезные изменения организма при изменении окружающей среды" (Гапочка, 1981), то увеличение активности каталазы в стрессовых условиях можно интерпретировать как один из механизмов адаптации.

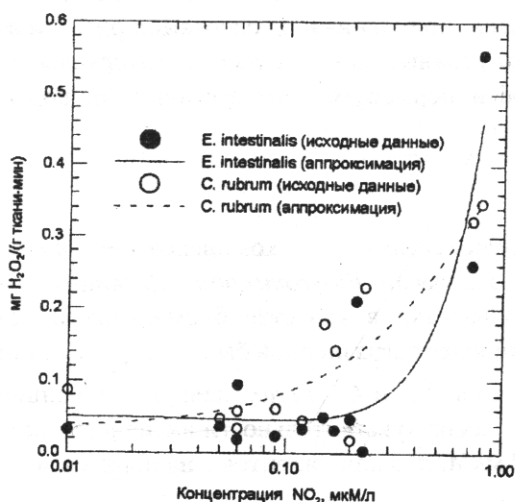
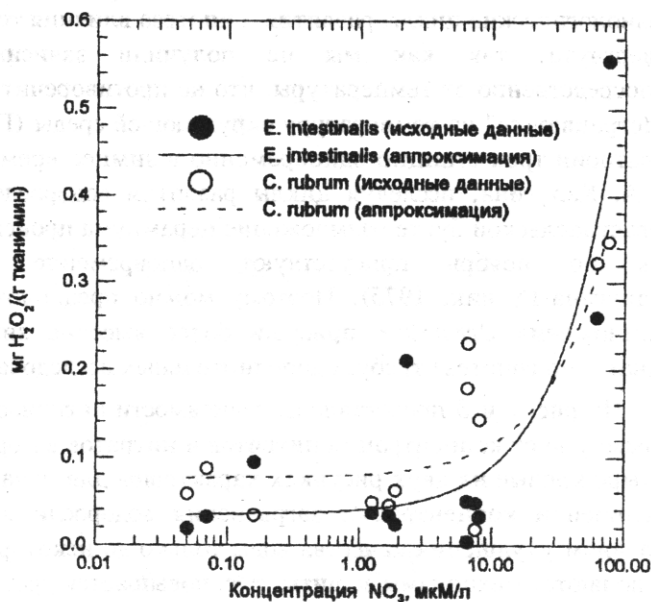


Рис. 2. Зависимость активности каталазы черноморских водорослей *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. и *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. от концентрации нитритов в среде.

Минимальная действующая концентрация загрязняющих веществ в среде является порогом чувствительности для активности каталазы в водорослях. Порог чувствительности для нитратов у энтероморфы и церамииума составляет 2 мкМ/л, а для нитритов у энтероморфы — 0,2 мкМ/л, у церамииума — 0,1 мкМ/л (рис. 1, 2). Таким образом, порог чувствительности активности каталазы для нитратов на порядок выше, чем для нитритов. Это, вероятно, можно объяснить тем, что нитратный азот используется при питании водорослей, в то время как нитритная форма азота, кроме того, обладает высокой способностью к окислению трехвалентного азота, приводящей к активации свободно-радикального процесса.

Рис. 3. Зависимость активности каталазы черноморских водорослей *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. и *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. от концентрации нитратов в среде.



Горизонтальные участки кривых на рис. 3 находятся на уровне 0,035 мг/(г·мин) для энтероморфы и 0,08 мг/(г·мин) для церамиума. Эти величины попали в доверительный интервал нормы отклика, полученный на основании рис. 1, а и 1, б, что подтверждает вывод о том, что полученные доверительные интервалы значений активности каталазы в энтероморфе и церамиуме соответствуют их нормальному функционированию.

Выводы

1. Активность фермента антиоксидантного комплекса — каталазы в организмах-индикаторах — зеленой водоросли *Enteromorpha intestinalis* и красной *Ceramium rubrum* может быть использована в качестве биомаркера импактности морских акваторий. Выявлено, что наиболее загрязненной была акватория станции 4.
2. Активность каталазы в *E. intestinalis* и *C. rubrum* зависит от концентрации нитратов и нитритов в морской воде. Порог чувствительности активности каталазы у водорослей для нитратов составляет 2 мкМ/л, а для нитритов — на порядок меньше.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннюю благодарность старшему научному сотруднику Морского гидрофизического института НАНУ А. С. Романову за предоставленные данные по гидрохимическому анализу морской воды. Настоящее исследование выполнено благодаря финансированию по гранту IN-TAS-96-1961, куратор д-р Уэльского ун-та, проф. Р.Б. Кэмп.

O.A. Shakhmatova, D.S. Parchevskaya

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Nakhimov Prosp., Sevastopol, 99011, Crimea, Ukraine

THE CATALASE ACTIVITY AND THE WATER QUALITY CONTROL

Possibility of use of the activity of antioxidant enzyme catalase from the seaweeds *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. and *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. as a biotest for environmental impact is demonstrated. The level of catalase activity for the normal seaweed function is determined. The threshold of catalase sensitivity of these seaweeds to nitrate was $2 \mu\text{M/l}$, and to nitrite it was an order of magnitude less.

Keywords: antioxidants, catalase activity, seaweeds, nitrate, nitrite, biotest, response norm, sensitivity threshold.

Березов Т. Т. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. – М.: Медицина, 1976. – С. 81-83.

Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П. и др. Водоросли: Справочник. – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.

Ганочка Л. Д. Об адаптации водорослей. – М.: Изд-во МГУ, 1981. – 80 с.

Израэль Ю. А. Экология и контроль состояния природной среды. – Л.: Гидрометеиздат, 1979. – 375 с.

Калугина-Гутник А. А. Фитобентос Черного моря. – Киев: Наук. думка, 1975. – 80 с.

Методы гидрохимических исследований океана. – М.: Наука, 1978. – 263 с.

Прайор У. Роль свободнорадикальных реакций в биологических системах // Свободные радикалы в биологии. – М.: Мир, 1979. – С. 6-13.

Федоров В. Д., Максимов В. Н., Сахаров В. Б. Количественный способ оценки внешних воздействий на экологические системы // Человек и биосфера. – М.: МГУ, 1980. – Вып. 5. – С. 12-23.

Фридович И. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Свободные радикалы в биологии. – М.: Наука, 1979. – С. 300-308.

Butler P. A., Andren L., Donde G., Jernelov A., Reish D. J. Monitoring organisms // FAO Fisher. Rep. – 1971, N 99, Suppl. 1. – P. 101-112.

Di-Giulio R. Y., Habig C., Gallagher E. P. Effect of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish // Aquat. Toxicol. – 1993. – 26, N 1/2. – P. 1-22.

Haug A., Helsen S., Omang S. Estimation of heavy metal pollution in two Norwegian fjords areas by analysis of the brown alga *Ascophyllum nodosum* // Environ. Poll. – 1974. – 7, N 1. – P. 179-192.

Livingstone D. R., Lemaire P., Mattheuws A., Peters L., Bucke D., Law R. J. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals // Mar. Poll. Bull. – 1993. – 26, N 11. – P. 602-606.

Livingstone D. R., Archibald S., Chipman J. K., March J. W. Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1992. – 91, N 1-3. – P. 97-104.

Peters L. D., Porte C., Albaiges J., Livingstone D. R. 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast in Spain // Mar. Poll. Bull. – 1994. – 28, N 5. – P. 299-304.

Winstone G. W., Di-Giulio R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // Aquat. Toxicol. – 1991. – 19, N 2. – P. 137-161.

Получена 18.06.99
Подписала в печать Л. А. Сиренко