

© Е.С. ОСИПОВА, Г.А. ПЕТУХОВА, А.Г. ПЕРЕКУПКА

es\_osipova@mail.ru, gpetuhova1@mail.ru, gtng@gtng.ru

УДК 574.47(063) + 504.4.064(063) + 504.06.08(063)

### **АКТИВАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ И ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ**

*АННОТАЦИЯ.* Изучено влияние нефтяного загрязнения на системы биохимической защиты растений. В качестве тест-объектов использовались рогоз узколистный (*Typha angustifolia* L.), осока сероватая (*Carex canescens* L.), собранные с территории разлива нефти на Кальчинском месторождении Тюменской области. В исследовании также использовался овес посевной (*Avena sativa* L.), выращенный на нефтезагрязненной почве и при поливе нефтезагрязненной водой с Кальчинского месторождения.

При выращивании овса посевного на нефтезагрязненной почве было отмечено угнетение морфофизиологических и биохимических показателей. При выращивании овса на воде, загрязненной нефтью, выявленные закономерности прослеживались слабее. Из растений, произрастающих на Кальчинском месторождении, наименее чувствительным к нефтяному загрязнению оказался рогоз узколистный, более чувствительной осока сероватая.

Нефтяное загрязнение вызывает возникновение в клетках растений продуктов перекисного окисления липидов: шиффовых оснований и диеновых конъюгатов. Повреждающее действие нейтрализуется системой биохимической защиты растений (каротиноидной, флавоноидной и фенольной). Парааминобензойная кислота частично снимает повреждающее действие нефти, что выражается в увеличении концентрации хлорофиллов, каротиноидов и флавоноидов. Наиболее эффективными веществами при защите клеток от окислительного стресса являются фенолы.

*SUMMARY.* The article explores the topic of the influence of oil pollution on the biochemical plant protection systems. The tests were carried out on the species of the narrow-leaved catoptric (*Typha angustifolia* L.) and hoary sedge (*Carex canescens* L.) collected from an oil spill in Kalchinskoe field of the Tyumen region. We also used cultivated oat (*Avena sativa* L.) which was grown in the oil contaminated soil and watered with oil contaminated water from Kalchinskoe field.

The article states that the morpho-physiological and biochemical features of the cultivated oat growing in the oil contaminated soil are negatively affected. Such negative effect was smaller in the cultivated oat watered with oil contaminated water. The narrow-leaved catoptric is the least sensitive to oil pollution and the hoary sedge is the most sensitive.

Oil pollution causes development of lipid peroxygenation products such as Schiff's bases and diethenoid conjugates in the plant cells. The damaging effect is neutralized by biochemical protection systems of the plants (such as carotenoid, flavonoid and phenolic). Para-aminobenzoic acid partially eliminates the negative effect of oil. It leads to increase in the concentration of chlorophyll, carotenoid and flavonoids. Phenols are the most effective substances in the biochemical plant protection system against oxidative stress.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.** Парааминобензойная кислота (ПАБК), нефтяное загрязнение, системы биохимической защиты растений, перекисное окисление липидов (ПОЛ).

**KEY WORDS.** Para-aminobenzoic acid, oil pollution, biochemical plant protection system, lipid peroxygenation.

**Введение.** В нефтедобывающей промышленности наиболее экологически опасны аварии, сопровождающиеся выбросами большого количества нефти в результате бурения или повреждения нефтепроводов.

Нефть в больших концентрациях оказывает ингибирующее воздействие на рост и развитие растений. На организменном уровне действие нефти проявляется в морфологических и физиологических нарушениях в отдельных растениях [1]. Под влиянием углеводородов происходит гибель растительного покрова, замедляется рост растений, отмечается хлороз и тенденция к обезвоживанию, нарушаются функции фотосинтеза и дыхания, изменяется структура хлоропластов [2].

При действии нефтяного загрязнения углеводороды нефти оказывают повреждающее действие на мембраны клеток, происходит образование свободных форм кислорода, которые инициируют разрушение липидов — перекисное окисление [3]. К основным продуктам перекисного окисления липидов относятся: диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, основания Шиффа. Известно, что в нормальных условиях жизнедеятельности клетки постоянно присутствует определенный уровень перекисного окисления липидов, индуцированный образованием активных форм кислорода. Перекисное окисление липидов в клетке поддерживается на постоянном уровне благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты. Таким образом, сбалансированность между обеими частями этой системы — перекисным окислением, с одной стороны, и антиоксидантной активностью, с другой, является необходимым условием для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки [4-5].

Фенольные соединения проявляют адаптогенное и стимулирующее действие. Фенольные соединения играют активную роль в самых различных физиологических процессах — фотосинтезе, дыхании, росте, защитных реакциях растительного организма [6]. К классу фенольных соединений относятся флавоноиды, выполняющие защитные функции. Флавоноиды являются восстанавливающими агентами и вместе с другими природными соединениями (каротиноиды, аскорбиновая кислота) способны защищать клетки от окислительного стресса [7].

Основные пигменты высших растений и зеленых водорослей — хлорофилл А и В. Молекула хлорофилла способна к фотохимическому преобразованию энергии возбужденных электронов в химическую энергию путем окислительно-восстановительных реакций [6]. Процесс фотосинтеза как очень чувствительный служит для биоиндикации загрязнения среды. При загрязнении в клетках растений уменьшается содержание хлорофилла [8]. К основным пигментам фотосинтеза, помимо хлорофиллов, относятся также каротиноиды. Кроме участия в процессе фотосинтеза каротиноиды выполняют функцию антиоксидантов, защищая фотосинтетический аппарат от окислительного стресса [9].

В качестве активатора защитных механизмов использовали парааминобензойную кислоту (ПАБК). Регулируя активность ферментов, ПАБК повышает адаптивность организма в неблагоприятных условиях среды, т.е. является адаптогеном [10].

Целью работы был анализ активации биохимических механизмов защиты растений и изменений физиологических показателей при действии почвы и воды, загрязненных нефтью с Кальчинского месторождения.

**Материалы и методы.** Кальчинское месторождение расположено в Уватском районе Тюменской области и разрабатывается ООО «ТНК-Уват». В середине мая 2008 г. на территории Кальчинского месторождения произошла утечка нефти из промышленного трубопровода. Нефть попала на почву и в кювет с водой, расположенный вдоль коридора коммуникаций. Была проведена техническая рекультивация места аварии (нефтезагрязненная почва засыпана песком) и химическая рекультивация (нефть собрана с помощью сорбентов).

Для оценки степени нефтяного загрязнения территории Кальчинского месторождения были взяты пробы воды, почвы и растения доминантных видов. В зависимости от степени загрязненности территории были выбраны 4 точки отбора проб: О1 (опыт 1) — в месте разлива нефти; О2 (опыт 2) — в 20 м от места разлива; О3 (опыт 3) — в 35 м от места разлива; К (контроль) — пробы с фоновой территории.

Химический анализ проб почвы с территории Кальчинского месторождения показал превышение предельно допустимой концентрации (ПДК) по железу, а также по нефтепродуктам и меди в районе максимального загрязнения.

В качестве тест-объектов были выбраны растения доминантных для данной территории видов: рогоз узколистный (*Typha angustifolia L.*), осока сероватая (*Carex canescens L.*), а также овес посевной (*Avena sativa L.*), используемый в рекультивационных травосмесях.

Анализ фитотоксичности почвы с Кальчинского месторождения определяли в экспериментах на овсе посевном. Семена выращивали в пластиковых стаканчиках, заполненных анализируемой почвой. Каждый опытный вариант ставился в 4-х повторностях: контроль — почва с Кальчинского месторождения с фоновой территории (К), опыт 1 — почва с места разлива нефти (О1), опыт 2 — почва из района в 20 м от места разлива (О2), опыт 3 — почва, взятая в 35 м от места разлива (О3), опыт 4 — почва с фоновой территории + 0,001% раствор парааминобензойной кислоты (О4), опыт 5 — комбинированное действие нефтяного загрязнения и ПАБК: почва с места разлива нефти + 0,001% раствор ПАБК (О5). Эксперимент длился 28 дней.

У всех исследуемых растений изучались такие показатели, как содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты и шиффовые основания), концентрация пигментов фотосинтеза, содержание флавоноидов и фенольных соединений.

**Результаты исследования и их обсуждение.** У рогоза узколистного с Кальчинского месторождения нефти увеличивалось содержание хлорофилла А и каротиноидов во всех опытных вариантах, содержание хлорофилла В повышалось у растений, собранных в 20 м от места аварии. Хлорофилл А является основным пигментом фотосинтеза, но при действии стресс-факторов растению необходимо увеличивать выработку органических веществ, что осуществляется за счет повышения концентрации вспомогательного хлорофилла В.

Анализ содержания фенольных соединений в рогозе узколистном с Кальчинского месторождения нефти (рис. 1) выявил увеличение данного показателя во всех опытных вариантах, что свидетельствует об активизации защитной системы растений при действии нефтяного загрязнения.

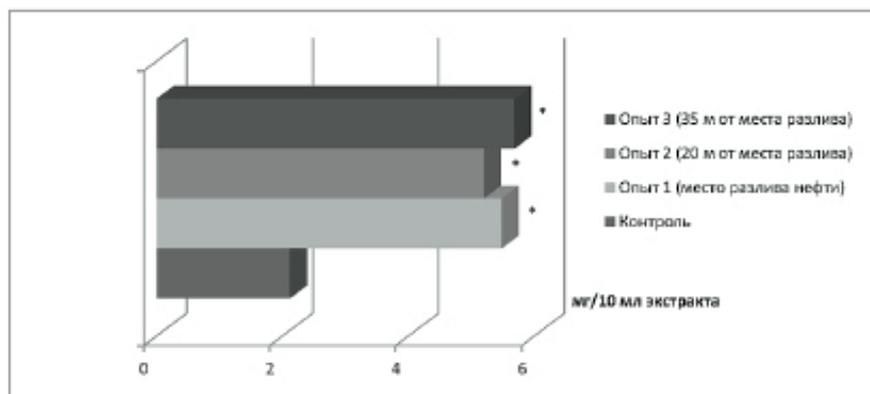


Рис. 1. Содержание фенольных соединений в рогозе узколистном с Кальчинского нефтяного месторождения

Примечание: \* — статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ( $P < 0,05$ ).

Содержание флавоноидов у рогоза узколистного снижалось в варианте с растениями, собранными в месте разлива нефти, что указывает на угнетенное состояние флавоноидной системы, которое наступает при высоких концентрациях нефти. Анализируемый показатель увеличивался у растений из района в 20 м от места разлива, что свидетельствует о включении биохимической защиты растений. В варианте с растениями, собранными с 35 м от места аварии, содержание флавоноидов выходило на контрольный уровень, это иллюстрирует нормализацию работы антиоксидантной системы защиты.

Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) у осоки сероватой с Кальчинского нефтяного месторождения (рис. 2) увеличивалось по отношению к контролю, что указывает на повреждающее действие нефти. Содержание шиффовых оснований при действии нефтяного загрязнения значительно не отличалось от контроля. Возможно, это объясняется активизацией работы защитных систем растения.

У осоки сероватой, собранной в районах разлива нефти и в 20 м от разлива, снижалась концентрация хлорофиллов. У растений, собранных в 35 м от места аварии, увеличивалось содержание хлорофиллов и каротиноидов. Каротиноиды энергично устраняют избыток активных форм кислорода, защищая пигменты и ненасыщенные жирные кислоты липидов от окислительного повреждения.

Содержание фенольных соединений в осоке сероватой возрастало во всех опытных вариантах, что указывает на активизацию биохимической системы защиты растений.

Содержание флавоноидов в осоке сероватой увеличивается у растений, собранных в месте разлива нефти и в 20 м от места разлива, что свидетельствует о включении защитной системы растений.

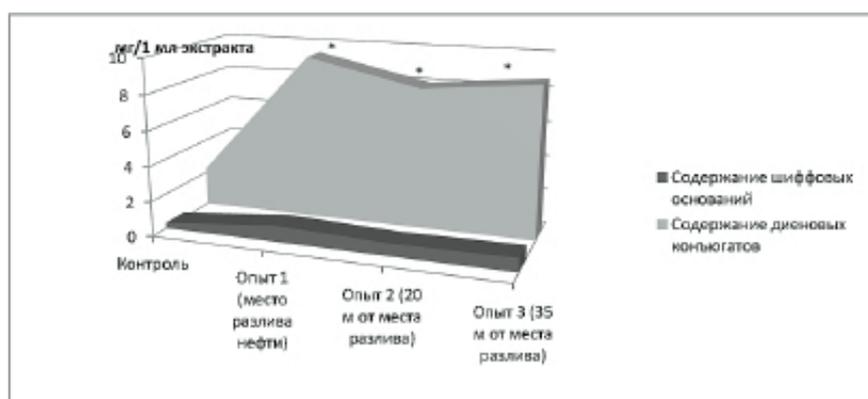


Рис. 2. Содержание шиффовых оснований и диеновых конъюгатов в осоке сероватой с Кальчинского месторождения

Примечание: \* — статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ( $P < 0,05$ ).

Таким образом, изучение биохимических систем растений, собранных с Кальчинского месторождения, показало наличие повреждающего действия нефти, проявляющееся в повышении содержания продуктов перекисного окисления липидов: диеновых конъюгатов и шиффовых оснований. Также была выявлена активизация работы систем биохимической защиты клетки, проявляющаяся в увеличении содержания каротиноидов, фенолов и флавоноидов. Наиболее эффективными в защите клеток растений от нефтяного загрязнения, по результатам наших исследований, являются фенольные соединения. Концентрация этих веществ увеличивается как у рогоза узколистного, так и у осоки сероватой во всех опытных вариантах.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов (шиффовых оснований и диеновых конъюгатов) в овсе посевном, выращенном на почве с Кальчинского месторождения нефти, повышалось во всех опытных вариантах, что говорит о наличии повреждений в клетке. Наименьшая концентрация продуктов ПОЛ отмечалась при комбинированном действии нефти и парааминобензойной кислоты, что свидетельствует о защитном действии ПАБК.

Содержание всех анализируемых пигментов фотосинтеза в овсе посевном уменьшалось во всех опытных вариантах, кроме концентрации каротиноидов при комбинированном действии нефти и парааминобензойной кислоты, что подтверждает защитное действие ПАБК.

При анализе содержания фенольных соединений в овсе посевном было выявлено снижение данного показателя во всех опытных вариантах, за исключением варианта с использованием парааминобензойной кислоты.

Анализ содержания флавоноидов в овсе посевном, выращенном на почве с Кальчинского нефтяного месторождения, показал снижение данного показателя при использовании почвы с места разлива нефти, что указывает на угнетенное состояние растений. В варианте с использованием парааминобензойной кислоты содержание флавоноидов снижается. В варианте с комбинированным действием нефти и парааминобензойной кислоты анализируемый показатель

также снижается, так как концентрация нефтепродуктов очень велика (4333,3 мг/кг почвы), и репараген не способен полностью восстановить повреждения. В варианте с почвой, взятой в 35 м от места аварии и при обработке парааминобензойной кислотой, содержание флавоноидов увеличивалось, что свидетельствует об активизации работы биохимических систем защиты.

По результатам проведенных экспериментов можно судить о повреждающем действии нефти на клетки овса посевного, что выражается в увеличении концентрации продуктов перекисного окисления липидов. Парааминобензойная кислота частично снимает угнетающий эффект нефти, что выражается в низкой, по сравнению с другими опытными вариантами, концентрации диеновых конъюгатов и шиффовых оснований. У овса посевного, выращенного на почве с Кальчинского нефтяного месторождения, концентрация веществ-антиоксидантов (каротиноиды, фенолы и флавоноиды) снижалась почти во всех опытных вариантах. Овес не является растением, произрастающим в естественных условиях на территории месторождения, следовательно, он хуже приспособлен к условиям нефтезагрязнения. Использование овса в рекультивационных смесях связано с его способностью накапливать загрязняющие вещества, однако при этом растение находится в угнетенном состоянии, что выражается в снижении концентрации веществ, отвечающих за биохимическую защиту клетки.

Был произведен расчет корреляционной зависимости между содержанием продуктов перекисного окисления липидов и концентрацией веществ-антиоксидантов. Была выявлена видоспецифичность работы биохимических систем защиты, проявляющаяся в активизации различных защитных систем у разных видов растений. Наиболее эффективными веществами при защите клеток от окислительного стресса являются фенолы.

#### **Выводы:**

1. При выращивании овса посевного на почве с Кальчинского нефтяного месторождения было отмечено угнетение морфофизиологических и биохимических показателей, парааминобензойная кислота частично снимала повреждающий эффект нефти. При выращивании овса на воде, загрязненной нефтью, выявленные закономерности прослеживались слабее.

2. Из растений, произрастающих на Кальчинском месторождении, наименее чувствительным к нефтяному загрязнению оказался рогоз узколистный, более чувствительной осока сероватая.

3. Нефтяное загрязнение вызывает возникновение в клетках растений продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов и шиффовых оснований), повреждающее действие ПОЛ нейтрализуется системой биохимической защиты растений (каротиноидной, флавоноидной и фенольной).

4. Отмечено защитное действие парааминобензойной кислоты при действии нефтяного загрязнения, проявляющееся в увеличении концентрации хлорофиллов, каротиноидов и флавоноидов.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Московченко Д.В. Нефтегазодобыча и окружающая среда: эколого-географический анализ Тюменской области: монография. Новосибирск, 1998. 112 с.
2. Кадакина И.В. Токсическое действие ВРФ Холмогорской и Шаимской нефти на морфофизиологические показатели ряски малой: Дипл. работа. Тюмень, 1991. 55 с.

3. Петухова Г.А. Эколого-генетические последствия воздействия нефтяного загрязнения на организмы: Дисс. ... д-ра биол. наук. Тюмень, 2007. 526 с.
4. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. 1991. Т. 111. Вып. 6. С. 923-932.
5. Anbar, M., Neta, P. Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions // Intern. J. Appl. Radiat. Isot. Vol. 18. 1967. P. 495-523.
6. Медведев С.С. Физиология растений: Учебник. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. 336 с.
7. Загоскина Н. В. Полифенолы и их роль в защите растений от действия стрессовых факторов // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: М-лы VI Междунар. симпозиума. 2005. Т. 3. С. 300-302.
8. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем: пер. с нем. Под ред. Р. Шуберта. М.: Мир, 1988. 350 с.
9. Филимонова М.В. Влияние экологических факторов на синтез низкомолекулярных антиоксидантов и накопление микроэлементов в лекарственных растениях подзоны средней тайги (в пределах Ханты-Мансийского автономного округа): Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Сургут, 2006. 23 с.
10. Строева О.Г. Биологические свойства парааминобензойной кислоты // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 4. С. 259-283.

## REFERENCES

1. Moskovchenko, D.V. *Neftgazodobycha i okružhajushhaja sreda: jekologo-geograficheskiy analiz Tjumenskoj oblasti* [Oil and Gas Production and Environment: Ecological and Geographical Analysis of Tyumen Region] Monograph. Novosibirsk, 1998. 112 p. (in Russian).
2. Kadakina, I.V. *Toksicheskoe dejstvie VRF Holmogorskoj i Shajmskoj nefti na morfofiziologicheskie pokazateli rjaski maloj* [Toxic Effect of VRF of Kholmogorskoy and Shaimskoi Oil on Morphophysiological Indices of Lemna Minor]. Tyumen, 1991. 55 p. (in Russian).
3. Petuhova, G.A. *Jekologo-geneticheskie posledstviya vozdejstviya neftjanogo zagrjaznenija na organizmy* (dokt. diss.) [Ecological and Genetic Consequences of Oil Pollution on Living Organisms (Diss. Doct)]. Tyumen, 2007. 526 p. (in Russian).
4. Baraboj, V.A. Stress mechanisms and Peroxidation of Lipids. *Uspehi sovremennoj biologii — Successes of Contemporary Biology*. 1991. Vol. 111. Issue 6. P. 923-932 (in Russian).
5. Anbar, M., Neta, P. Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions. *Intern. J. Appl. Radiat. Isot.* Vol. 18. 1967. Pp. 495-523.
6. Medvedev, R.R. *Fiziologija rastenij* [Physiology of Plants] Textbook. St. Petersburg: St.-Petersburg State University publ., 2004. 336 p. (in Russian).
7. Zagoskina, N.V. Polyphenols and their Role in Plant Protection from Stress Factors. *Novye i netradicionnye rastenija i perspektivy ih ispol'zovanija* (New and Non-Traditional Plants and Perspectives of their Usage. Materials of VI International Symposium). 2005. Vol. 3. P. 300-302 (in Russian).
8. *Bioindikacija zagrjaznenij nazemnyh jekosistem* [Bioindication of Contaminations of Terrestrial Ecosystems]. Ed. by R. Shubert. M.: Mir, 1988. 350 p. (in Russian).
9. Filimonova, M.V. *Vlijanie jekologicheskix faktorov na sintez nizkomolekuljarnyx antioksidantov i nakoplenie mikroelementov v lekarstvennyh rastenijah podzony srednej tajgi (v predelah Hanty-Mansijskogo avtonomnogo okruga)* (avtoref. diss. kand. ) [Influence of Ecological Factors on Synthesis of Low-Molecular Antioxidants and Accumulation of Microelements in Medicinal Plants of Middle Taiga Sub-Zone (within Khanty-Mansy Autonomous Region) (Cand. Diss. Thesis)]. Surgut, 2006. 23 p. (in Russian).
10. Stroeveva, O.G. Biological Properties of Para-Aminobenzoic Acid. *Ontogeny. Ontogenez — Ontogeny*. 2000. Vol. 31. № 4. Pp. 259-283 (in Russian).