



J x УДК 581.144.2+581.524+581.55

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ПОЛІФЕНОЛІВ У РОСЛИНАХ *CAREX HIRTA L.* ТА *FABA BONA MEDIC.* (*VICIA FABA L.*) ЗА ДІЇ НАФТОВОГО ЗАБРУДНЕННЯ

О. Карпин¹, О. Цвілинюк¹, О. Терек¹, З. Диньо², Л. Шимон²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Вища школа м. Ніредьгаза, вул. Шошто, 31/Б, Ніредьгаза 4400, Угорщина
e-mail:olgakarpyn@gmail.com

У модельному експерименті досліджено вплив нафтового забруднення на вміст поліфенолів і загальну антиоксидантну активність у рослинах *Carex hirta L.* та *Faba bona Medic.* (*Vicia faba L.*). Рослини бобів і осоки на ґрунті з нафтою (50 г/кг) містили більше поліфенолів, ніж рослини на чистому (контрольному) ґрунті. За дії нафтового забруднення загальна антиоксидантна активність зростала у рослинах осоки, а в рослинах бобів – знижувалась.

Ключові слова: нафтове забруднення, *Carex hirta L.*, *Faba bona Medic.* (*Vicia faba L.*), поліфеноли, загальна антиоксидантна активність.

ВСТУП

Унаслідок нафтового забруднення рослина перебуває під впливом нагромаджених у ґрунті різноманітних за складом і властивостями токсичних нафтопродуктів. Доведено, що вуглеводні можуть проникати у рослину через корені, кутикулу і пори листків, транспортуватися по рослині та включатись у метаболізм [6]. Період гострої фітотоксичної дії нафти визначається вмістом у ній циклічних і поліциклічних ароматичних вуглеводнів, котрі досить швидко випаровують із ґрунту. Подальша негативна дія нафтового забруднення на рослини зумовлена погіршенням ґрунтових умов під впливом високомолекулярних компонентів нафти. Смоли й асфальтени утворюють на поверхні ґрунту щільну кірку, непроникну для води і повітря. Зміна фізико-хімічних і біологічних якостей ґрунту (погіршення повітряно-водного балансу, зміна кислотності, зникнення аборигенної мікрофлори та ін.) під впливом нафти приводить до істотної, а то й повної втрати ним природних агрофізіологічних функцій. Рослинність у ділянках нафтового забруднення або відсутня, або представлена поодинокими, стійкими до нафтового забруднення видами [7].

Нафтове забруднення призводить до гальмування росту рослин, зниження у них вмісту фотосинтетичних пігментів і запуску реакцій оксидативного стресу. Однією

зі складових адаптаційного синдрому рослин в умовах стресу, індукованого забрудненням ґрунту нафтою, є універсальна неспецифічна реакція на стрес – генерування у клітинах високоактивних похідних кисню, які дають початок низці інших радикалів та ініціюють вільнорадикальне перекисне окиснення ліпідів, а також здатні спричинити денатурацію білків, інактивацію ферментів, вицвітання пігментів, фрагментацію і мутації ДНК [4, 5]. Показано, що у рослинах в умовах нафтового забруднення зростає активність процесів перекисного окиснення ліпідів [1].

Окисненню життєво важливих біомолекул рослинної клітини протистоїть антиоксидантна система. Результати ряду досліджень показують, що стійкість рослин до несприятливих впливів значною мірою визначається станом захисту рослинного організму від активних форм кисню. На сьогодні нагромаджений великий обсяг експериментального матеріалу, котрий вказує на те, що стійкі види і сорти рослин мають підвищений вміст антиоксидантів, зокрема, аскорбату, α -токоферолу, глутатіону й інших речовин, які беруть участь в елімінації кисневих радикалів [3, 4].

Важлива роль у підтримці рослинного організму в необхідному для життя відновленому стані належить сполукам фенольної природи. Поліфеноли – вторинні метаболіти рослинного організму [8, 11], котрі захищають його від окиснювального пошкодження. Синтез поліфенолів посилюється у стресових умовах [9, 15].

Процес адаптації рослин до нафтового забруднення є зручним об'єктом для дослідження антиоксидантної системи. У даній роботі ми намагались дослідити, як нафтове забруднення впливає на вміст поліфенолів і загальну антиоксидантну активність у рослинах бобів та осоки.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для досліду використовували нафту, видобуту на території м. Борислава. Підготовку ґрунту і рослин для аналізу проводили за такою схемою. У ґрунт вносили нафту в концентрації 50 г/кг. Через три тижні (цей період необхідний для вивірювання найбільш токсичних вуглеводнів) висаджували рослини осоки та насіння бобів. Рослини осоки аналізували через місяць після пересадки у нафтозабруднений ґрунт, рослини бобів – через місяць після посіву. Як контроль використовували рослини, котрі зростали на ґрунті без нафти.

Рослинний матеріал висушували в сушильній шафі при $+70^{\circ}\text{C}$. Сухий рослинний матеріал спершу екстрагували сумішшю хлороформу з метанолом (9:1), отриманий екстракт витримували в ультразвуковій водяній бані (Elmasonic S 100 H) за кімнатної температури впродовж 15 хв. Опісля екстракт відфільтровували і випаровували на Rotavapor R-215. Сухий залишок реекстрагували метанолом. Екстракт використовували для визначення вмісту поліфенолів і загальної антиоксидантної активності.

Визначення вмісту **поліфенолів** [15] проводили у спиртових екстрактах із рослинного матеріалу за методикою Фоліна-Ціокальтеу. До 100 мкл екстракту додавали 500 мкл реактиву Фоліна-Ціокальтеу і 6 мл дистильованої води. Через 20 хв додавали 300 мг Na_2CO_3 , доводили об'єм дистильованою водою до 10 мл і залишали на 2 год. Оптичну густину суміші визначали на UV/VIS спектрометрі (Perkin Elmer Lambda 35) при довжині хвилі 725 нм. Вміст поліфенолів виражали у мг еквівалентах галової кислоти на грам маси сухої речовини (DW).

Загальна антиоксидантна активність низькомолекулярних антиоксидантів проявляється у реакції рослинного екстракту з розчином радикала – 1,1-дифеніл-

2-пікрілгідразилу (DPPH). При взаємодії розчину радикала зі сполукою, що є донором електронів, відбувається відновлення молекули DPPH, яке супроводжується зміною забарвлення вихідного розчину із фіолетового на блідо-жовте. Найактивніше реагують з DPPH аскорбінова кислота, α -токоферол, глутатіон, флавоноїди та інші низькомолекулярні сполуки [12, 13].

Для визначення загальної антиоксидантної активності [10] до 2,8 мл 60 мМ розчину DPPH у метанолі додавали 0,2 мл спиртового екстракту із рослинного матеріалу. Зменшення оптичної густини розчину фіксували впродовж 15 хв на UV/VIS спектрометрі (Perkin Elmer Lambda 35) при довжині хвилі 517 нм. Відсоток зменшення оптичної густини розчину визначали за формулою:

$$(\%) = [(A_0 - A_1)/(A_0)] \times 100,$$

де A_0 – оптична густина спиртового розчину DPPH; A_1 – оптична густина спиртового розчину DPPH через 15 хв після додавання рослинного екстракту.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Виявлено, що за дії нафтового забруднення ґрунту у рослинах *Carex hirta* L. та *Faba bona Medic. (Vicia faba L.)* зростає загальний вміст поліфенолів (рис. 1). Листки рослин осоки містили в 5,6 разу, а кореневища – у 2 рази, листя рослин бобу – в 1,5 разу, а їхні корені – в 11,5 разу більше поліфенолів, порівняно з контролем.

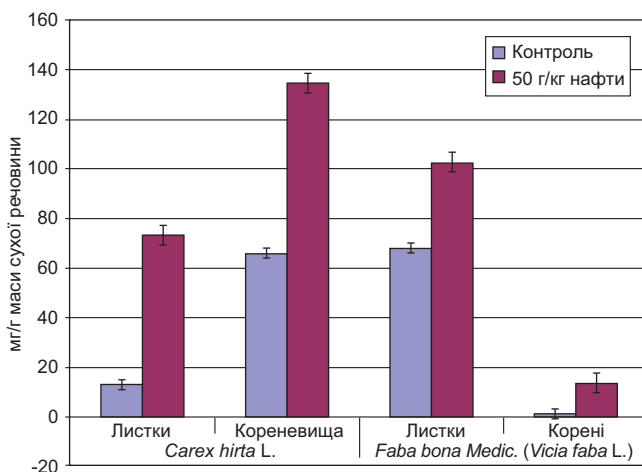


Рис. 1. Загальний вміст поліфенолів у рослинах *Carex hirta* і *Faba bona Medic. (Vicia faba L.)* за дії нафтового забруднення ґрунту

Fig. 1. Total polyphenol contents in *Carex hirta* and *Faba bona Medic. (Vicia faba L.)* plants under oil pollution of soil

Відомо, що поліфеноли протидіють окиснювальному стресові: знешкоджують активні форми кисню, підтримують внутрішнє середовище клітини у відновленому стані, а також позитивно впливають на активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази і каталази) [15]. Підтвердженням цього можуть бути результати визначення вмісту пероксиду водню у рослинах бобів, отримані нами раніше [2]. Так, вміст пероксиду водню у рослинах на ґрунті з нафтою був нижчий, ніж у контролі. Така реакція може свідчити про участь поліфенолів у знешкодженні пероксиду водню в несприятливих умовах.

Основним джерелом активних форм кисню у рослинному організмі є фотосинтетичні процеси, відповідно, основна кількість антиоксидантів локалізована в листках. У ході попередніх досліджень [2] виявлено, що вміст перексиду водню в листках рослин бобів у кілька разів перевищував його вміст у коренях. Вміст поліфенолів у листі рослин бобу також був значно вищим, ніж у коренях (рис. 1). У кореневищах рослин осоки вміст поліфенолів значно перевищував вміст цих антиоксидантів у надземній частині (рис. 1). Відомо, що саме завдяки кореневищам відбувається вегетативне розмноження рослин осоки і проникнення їх із чистої території на забруднену. Можливо, високий вміст фенольних речовин забезпечує захист цих фізіологічно важливих органів рослини від окиснювального стресу.

У рослинах осоки шорстковолосистої збільшення вмісту поліфенолів під впливом нафти позитивно корелювало з підвищенням загальної антиоксидантної активності (рис. 2).

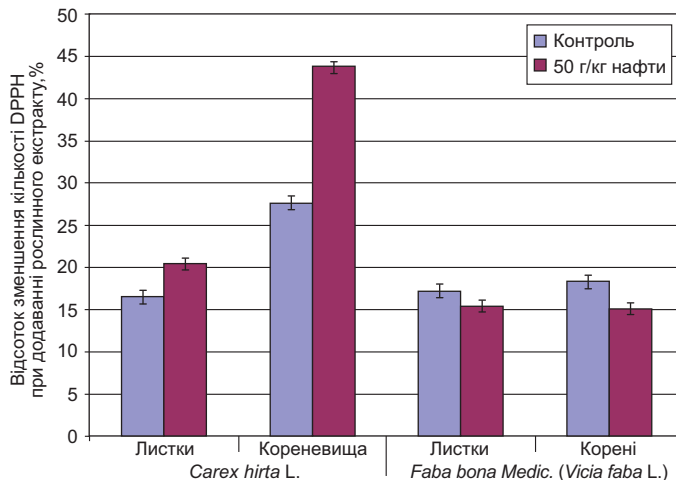


Рис. 2. Загальна антиоксидантна активність екстрактів із рослин *Carex hirta* L. і *Faba bona Medic. (Vicia faba L.)*, вирощених в умовах нафтового забруднення

Fig. 2. Total antioxidant activity of the extracts of *Carex hirta* L. and *Faba bona Medic. (Vicia faba L.)* plants grown under oil pollution

У рослинах осоки шорстковолосистої під впливом нафтового забруднення зафіксовано підвищення загальної антиоксидантної активності (рис. 2). У контролі відсоток знешкодження DPPH був значно нижчий, ніж за впливу нафти (рис. 2). У листках рослин осоки в умовах нафтового забруднення антиоксидантна активність зросла на 3,9%, а в кореневищах – на 16%. Підвищення загальної антиоксидантної активності в кореневищах і листках рослин осоки за дії нафтового забруднення свідчить про реакцію рослин, спрямовану на захист від окиснення компонентів рослинної клітини. Як і вміст поліфенолів, загальна антиоксидантна активність була значно вищою у кореневищах рослин осоки, ніж у надземній частині. Відсоток знешкодження радикалів DPPH у кореневищах рослин осоки шорстковолосистої за дії нафти становив 43,7%, а в листках – 21,7%. Можна припустити, що саме низькомолекулярні сполуки, відповідальні за встановлену загальну антиоксидантну активність, відіграють важливу роль у захисті тканин кореневища від окиснювального пошкодження в умовах стресу.

Загальна антиоксидантна активність у листках рослин бобів, які росли під впливом нафтового забруднення, знижувалась щодо контролю, незважаючи на те,

що вміст поліфенолів у рослинах бобу в умовах нафтового забруднення підвищувався. Варто нагадати, що рівень загальної антиоксидантної активності визначається антирадикальною активністю й інших низькомолекулярних антиоксидантів, зокрема, аскорбінової кислоти, глутатіону, α -токоферолу. Можна припустити, що саме зменшення вмісту цих сполук за умов стресу спричинило зниження загальної антиоксидантної активності. Іншим імовірним поясненням зниження антиоксидантної активності на фоні високого вмісту поліфенолів може бути їхня участь в інших процесах життєдіяльності, не пов'язаних зі знешкодженням кисневих радикалів. Адже відомо, що поліфеноли є багатофункціональними вторинними метаболітами рослинної клітини. Окрім захисної, вони виконують структурну функцію як компоненти епідермісу, беруть участь в утворенні азотфіксувальних бульбочок у бобових та ін. [14]. Однак ці припущення потребують подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

Під впливом нафтового забруднення загальний вміст поліфенолів у рослинах *Carex hirta* L. та *Faba bona Medic. (Vicia faba L.)* зростав. Високий вміст поліфенолів зафіксовано у кореневищах рослин осоки і листках бобів. Загальна антиоксидантна активність осоки, що зросла в умовах нафтового забруднення ґрунту, була вищою, ніж у контролі. У рослинах бобів під впливом нафти загальна антиоксидантна активність знижувалася, що свідчить про функціонування у них інших механізмів захисту в умовах нафтового забруднення.

1. *Джура Н.М. Фізіологічні аспекти адаптації рослин до нафтового забруднення середовища на Бориславщині*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12. Львів, 2006. 16 с.
2. *Карпин О., Джура Н., Цвілинюк О., Терек О.* Вплив нафтового забруднення ґрунту на ростові показники, вміст пероксиду водню та активність пероксидази рослин бобу (*Vicia faba L.*). *Вісн. Львів. у-ту. Сер. Біол.*, 2008; 47: 160–165.
3. **Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях**. Под ред. чл.-кор. НАН Украины Е.Л. Кордюм. Київ: Наукова думка, 2003. 277 с.
4. *Колупаев Ю.Є. Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень)*. Харків: Харківський державний аграрний університет, 2001. 173 с.
5. *Терек О.І.* Механізми адаптації та стійкості рослин до несприятливих факторів довкілля. *Журнал агробіології та екології*, 2004; 1 (1–2): 41–56.
6. *Угрехелидзе Д.Ш. Метаболізм екзогенних алканов і ароматических углеводородов в растениях*. Тбілісі: Мецниереба, 1976. 222 с.
7. *Цайтлер М.Й.* Відновлення рослинного покриву і зміни структури ценопопуляцій трав'яних рослин на нафтозабруднених територіях Бориславського нафтового родовища. Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 2001. 16 с.
8. *Bravo L.* Phenolic phytochemicals: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 1998; 56: 317–333.
9. *Briskin D.P.* Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol*, 2000; 124: 507–514.
10. *Cervato G., Carabelli M., Gervasio S. et al.* Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. *J. Food Biochem.*, 2000; 24: 453–465.
11. *Crozier A., Burns J., Aziz A.A. et al.* Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol. Res.*, 2000; 33: 79–88.
12. *Molyneux P.* The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technolog.*, 2004; 26 (2): 211–219.

13. Okawa M., Kinjo J., Nohara T., Ono M. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medical plants. **Biol. Pharm. Bull.** 2001; 24 (10): 1202–1205.
14. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet** / Edited by A. Crozier, M.N. Clifford, H. Ashihara. Blackwell Publishing Ltd, 2006. 372 p.
15. Shetty K. Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications; a review. **Process Biochem.** 2004; 39: 789–803.

ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND PHENOLIC CONTENTS OF *CAREX HIRTA* L. AND *FABA BONA MEDIC.* (*VICIA FABAE* L.) PLANTS UNDER OIL CONTAMINATION

O. Karpyn¹, O. Tsvilynjuk¹, O. Terek¹, Z. Dinya², L. Simon²

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

²College of Nyiredyhaza, 31/B, Sostou St., Nyiredyhaza 4400, Hungary

The influence of oil contamination on the amounts of polyphenols and total antioxidant activity in *Carex hirta* L. and *Faba bona Medic.* (*Vicia faba* L.) plants were explored in model experiments. Bean and sedge plants that grew in soil with crude oil (50 g/kg) contained more polyphenols, than plants which grew in clean (control) soil. Under oil contamination, general antioxidant activity increased in sedge plants, and decreased in bean plants.

Key words: oil contamination, *Carex hirta* L., *Faba bona Medic.* (*Vicia faba* L.), polyphenols, total antioxidant activity.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ В РАСТЕНИЯХ *CAREX HIRTA* L. И *FABA BONA MEDIC.* (*VICIA FABAE* L.) ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

О. Карпин¹, О. Цвилянчук¹, О. Терек¹, З. Диньо², Л. Шимон²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко

ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

²Высшая школа Ниредьгаза, ул. Шошто, 31/Б, Ниредьгаза 4400, Венгрия

В модельном эксперименте исследовано влияние нефтяного загрязнения на содержание полифенолов и общую антиоксидантную активность в растениях *Carex hirta* L. и *Faba bona Medic.* (*Vicia faba* L.). Растения конских бобов и осоки, произраставшие на почве с нефтью (50 г/кг), содержали больше полифенолов, чем растения на чистой (контрольной) почве. Под действием нефтяного загрязнения общая антиоксидантная активность увеличивалась в растениях осоки, а в растениях конских бобов – снижалась.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, *Carex hirta*, *Faba bona Medic.* (*Vicia faba* L.), полифенолы, общая антиоксидантная активность.

Одержано: 07.09.2009