

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ФГАОУВПО «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОЭКОЛОГИИ

Специальность: 020803.65 – биоэкология
Специализация: биолог-эколог

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

СТУДЕНТКИ V КУРСА

ЕЛАГИНОЙ ДАРЬИ СЕРГЕЕВНЫ

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ – ФЛАВОНОИДОВ И ХЛОРОФИЛЛОВ МАРИ
БЕЛОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ПРОИЗРАСТАНИЯ**

Работа завершена:

« _____ » _____ 2013 г. _____ (Д. С. Елагина)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
кандидат биологических наук, доцент
« _____ » _____ 2013 г. _____ (Н.С. Архипова)

Заведующий кафедрой
доктор биологических наук, профессор
« _____ » _____ 2013 г. _____ (И.И.Рахимов)

Казань - 2013

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Содержание флавоноидов и хлорофилла в листьях мари белой как индикатор состояния окружающей среды.....	5
1.1 Роль вторичных метаболитов в адаптационных возможностях растений.....	5
1.1.1 Общая характеристика вторичного метаболизма растений	5
1.1.2 Флавоноиды растений: разнообразие, значение, особенности накопления.....	15
1.1.3 Влияние экологических и биологических факторов на накопление флавоноидов.	19
1.1.4 Растительное сырье как источник флавоноидов (с учетом экологической безопасности)	24
1.2 Пигментный аппарат растений и его особенности в зависимости от условий произрастания.....	25
Глава 2. Материалы и методы исследования	30
2.1 Характеристика объекта исследования	30
2.2 Сбор растительного сырья и подготовка образцов для анализа	31
2.3 Методика количественного определения суммы флавоноидов в растительном сырье спектрофотометрическим методом	36
2.4 Количественное определение пигментов	39
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	41
3.1 Оценка экологических условий в точках сбора растительного сырья... ..	41
3.2 Влияние условий произрастания на содержание флавоноидов	46
3.3 Влияние условий произрастания на содержание хлорофиллов.....	48
3.4 Изменение содержания флавоноидов и хлорофиллов в листьях мари белой как показатель состояния окружающей среды	53
Выводы	54
Литература	55
Приложения	Ошибка! Закладка не определена.

Введение

В настоящее время пристальное внимание уделяют изучению веществ вторичного метаболизма в связи с их огромным разнообразием и недостаточной изученностью их роли и функции в организме. Выявлено более десятка групп вторичных метаболитов. Хорошо известны три самые большие — алкалоиды, изопреноиды (терпеноиды) и фенольные соединения. Среди них флавоноиды являются классом растительных полифенолов, обладающих широким спектром действия, обусловленным их антиоксидантными свойствами, антибактериальными и фунгицидными качествами. Они выполняют защитные функции, предохраняя растения от различных неблагоприятных воздействий окружающей среды. Установлено, что, поглощая ультрафиолетовые лучи, флавоны, флавонолы и антоцианы предохраняют хлорофилл и цитоплазму клеток от разрушения [15]. В процессе адаптации растений к действию неблагоприятных факторов участвуют многие метаболические процессы, в том числе изменение фотохимической активности, регулируемой концентрацией пигментов в фотосинтетических мембранах [3]. В ряде работ показано, что хлорофилл чувствительно реагирует на все изменения в обмене веществ и при неблагоприятных условиях изменяется как его общее содержание, так и соотношение отдельных форм (a/b) [10, 41, 53].

Флавоноиды широко распространены в растительном мире. Особенно богаты ими высшие растения, относящиеся к семействам розоцветных (различные виды боярышников, черноплодная рябина), бобовых (софора японская, стальник полевой, солодка), гречишных (различные виды горцев - перечный, почечуйный, птичий; гречиха), астровых (бессмертник песчаный, сушеница топяная, пижма), яснотковых (пустырник сердечный) и другие. Находятся флавоноиды в различных органах, но чаще в надземных: цветках, листьях, плодах; значительно меньше их в стеблях и подземных органах. Наиболее богаты ими молодые цветки, незрелые плоды. Содержание флавоноидов в растениях различно: в среднем 0,5-5%, иногда достигает 20%

(в цветках софоры японской). Содержание их может меняться в зависимости от места произрастания [35], фазы онтогенеза [37], эколого-фитоценологических [33] и экологических условий, в том числе техногенного загрязнения [19].

В последние годы все больше внимания уделяется поиску новых лекарственных растений и разработке препаратов из растительного сырья, используемого в народной медицине. Обильные массивы сорничающей мари белой, с учетом экологической чистоты, могут быть рассмотрены с позиций возможного использования в качестве дешевого источника этих ценных биологически активных соединений [12].

В связи с вышеизложенным, целью исследования было изучить влияние промышленных поллютантов, автомобильных выбросов и повышенной запыленности на накопление биологически активных веществ – флавоноидов и хлорофиллов мари белой (*Chenopodium album L.*).

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ количественного состава суммы флавоноидов в растениях мари белой (*Chenopodium album L.*) из местообитаний отличающихся уровнем техногенной нагрузки.
2. Выявить влияние условий местообитания на общее содержание хлорофилла и соотношение его отдельных форм (a/b) в листьях мари белой.
3. Оценить возможность использования показателя количественного содержания флавоноидов в целях биоиндикации окружающей среды.

Глава 1. Содержание флавоноидов и хлорофилла в листьях мари белой как индикатор состояния окружающей среды

1.1 Роль вторичных метаболитов в адаптационных возможностях растений

1.1.1 Общая характеристика вторичного метаболизма растений

Хорошо известны три самые большие группы вторичных метаболитов — алкалоиды, изопреноиды (терпеноиды) и фенольные соединения. Каждая из этих групп состоит из нескольких тысяч соединений и подразделяется на многочисленные подгруппы. Известно также около десятка менее многочисленных групп вторичных метаболитов: растительные амины, небелковые аминокислоты, цианогенные гликозиды, глюкозинолаты, полиацетилены, беталаины, алкиламидамы, тиофены и др. Количество соединений, входящих в эти группы, колеблется от единиц до нескольких сотен.

Вторичные метаболиты в растении практически никогда не присутствуют в «чистом виде», они, как правило, входят в состав сложных смесей. Такие смеси в зависимости от их состава и нахождения в растении часто носят собственные, исторически сложившиеся названия. Эфирные масла, как правило, представляют из себя смесь легко испаряющихся изопреноидов (моно- и сесквитерпенов). Смолы представлены главным образом дитерпенами. Камеди состоят преимущественно из полисахаридов, но в их состав часто входят алкалоиды, фенольные соединения. Слизи — это смесь водорастворимых олиго- и полисахаридов, сахаров, а также небольших количеств фенольных соединений, алкалоидов или изопреноидов [28].

Алкалоиды. К настоящему времени известно около 10 тысяч алкалоидов, и они обладают высокой фармакологической активностью. Содержание алкалоидов в растительном сырье обычно не превышает нескольких процентов, но в коре хинного дерева их количество достигает 15-20%. Алкалоиды могут концентрироваться в различных органах и тканях.

При этом часто они накапливаются не в тех тканях, где синтезируются. Например, никотин синтезируется в корнях табака, а запасается в листьях. Большинство алкалоидов – это кристаллические порошки, без запаха и горькие на вкус. Среди алкалоидов есть и такие, что представляют собой маслянистые растворы. Алкалоиды вырабатываются в процессе разложения аминокислот. В разных частях одного и того же растения может быть совершенно разное содержание алкалоида. И даже более того, в плодах может быть один алкалоид, а в корнях совсем другой. Среди наиболее известных алкалоидов можно назвать морфин, кодеин, папаверин, которые были выделены из коробочек мака снотворного (*Papaver somniferum*).

Алкалоиды алифатической структуры в большинстве своем содержатся в южных растениях. Всем известный стручковый перец или жгучий перец содержит алкалоид - капсаицин. Чем более острый перец, тем больше в нем алкалоида. Знаменитый алкалоид эфедрин получают из растений под названием эфедр или хвойник. Почти все названия алкалоидов происходят от латинских видовых названий растений, в которых они обнаружены. Одним из наиболее известных стероидных алкалоидов является, наверное, соласонин. Этот алкалоид содержится в очень распространенном растении, в изобилии, растущем в умеренном и субтропическом климате. Растение это паслен птичий (*Solanum nigrum*) и дольчатый (*Solanum laciniatum*). В официальной медицине стероидные алкалоиды практически не используются, а вот в нетрадиционной медицине ими иногда довольно успешно лечат онкологию крови [49].

Пуриновые алкалоиды. Именно эти алкалоиды каждый из нас употребляет вместе с пищей и не один раз в день. В кофейном дереве содержится алкалоид кофеин. Кофеин активно влияет на нервную систему, возбуждая ее, снимая головные боли. Однако, при передозировке алкалоида кофеина в крови возможно перевозбуждение, тахикардия. И еще одно растение, которое снабжает многих из нас алкалоидом – это кола. В настоящих, «фирменных» напитках содержится экстракт из плодов этого

дерева. В них довольно много алкалоидов. Все тот же кофеин, и к нему прибавляется теобромин. Экстракт плодов колы применяют и в медицине для активации деятельности сердца, возбуждения нервной системы.

Изопреноиды. По числу выделенных соединений изопреноиды превосходят все другие классы вторичных метаболитов (их более 23 тысяч), но по фармакологической активности они уступают алкалоидам. В данную группу объединены разные по строению соединения. Некоторые из них невозможно заменить синтетическими препаратами, например, таксолы, выделенные из коры тиссового дерева. Они являются чрезвычайно активными цитостатиками, действуя на раковые клетки в очень малых дозах. Наиболее важную группу изопреноидов составляют сердечные гликозиды, или карденолиды. Например, из двух видов наперстянки пурпуровой (*Digitalis purpurea*) и шерстистой (*D. lanata*) выделено около 50 карденолидов, в том числе дигитоксин. Сердечные гликозиды из ландыша майского (*Convallaria majalis*) по активности превосходят другие сердечные гликозиды (например, дигитоксин).

Другие важные для медицины группы изопреноидов представляют собой тритерпеновые гликозиды, или сапонины. Большинство представителей этой группы имеют высокую биологическую активность, которая обуславливает их лечебное действие и применение таких известных биостимуляторов, как женьшень, аралия, солодка.

Стероидные гликозиды отличаются по биологической активности от тритерпеновых [8]. Для современной медицины это исходное сырьё для синтеза многих гормонов и противозачаточных средств. Начиная с 40-х годов прошлого столетия для получения стероидного сырья, в основном, используют гликозид диосгенин из корневищ различных видов лиан из рода *Dioscorea*. В настоящее время из него получают более 50% всех стероидных лекарственных средств. Цианогенные гликозиды, содержащие в составе агликона синильную кислоту, довольно часто встречаются в растительном мире. Из цианогенных гликозидов в медицинской практике нашел

применение амигдалин - гликозид, содержащийся в косточках многих растений рода Слива (*Prunus*), придавая им горький вкус. Впервые выделен из горького миндаля (*Prunus amygdalus*).

Тиогликозиды (S-гликозиды) характерны для растений семейства крестоцветных (горчица, хрен, редька, редис), но они содержатся также в некоторых растениях других семейств, например лилейные (чеснок, лук). Тиогликозиды обладают одним общим свойством — они при гидролизе раздражающе действуют на слизистые оболочки и кожу человека. Благодаря этому свойству некоторые растения, содержащие тиогликозиды, издавна используются в качестве сырья для получения лекарств, оказывающих местное раздражение или отвлекающее действие. Агликон S-гликозидов обычно достаточно сложен и при гидролизе распадается на ряд компонентов, в числе которых всегда имеется серосодержащее эфирное масло.

Фенольные соединения. К фенольным соединениям относят вещества, содержащие в своей молекуле бензольное кольцо, которое несет одну или несколько гидроксильных групп, называемых также "фенольными группировками". Соединения, имеющие две и более гидроксильные группы, получили название полифенолов. И хотя растительные фенолы отнесены к веществам вторичного или специализированного метаболизма, которым по определению свойственна хемоспецифичность, многие из них, например, флавоноиды или лигнин, универсальны по своей распространенности в природе. Самая многочисленная и широко распространённая в растениях группа фенольных соединений - флавоноиды. Они накапливаются в корнях солодки (*Glycyrrhiza glabra*), траве пустырника (*Leonurus cordiaca*), цветках бессмертника (*Helichryzum arenarium*). Флавоноиды отличаются широким спектром фармакологического действия. Они обладают желчегонным, бактерицидным, спазмолитическим, кардиотоническим действием, уменьшают ломкость и проницаемость сосудов (например, рутин), способны связывать и выводить из организма радионуклиды, у них также выявлен противораковый эффект [65].

Не для всех исследованных вторичных метаболитов удалось понять их функции. Есть такие, которые похожи на «отходы» первичного метаболизма. Другие, наоборот, играют огромную роль в жизни растения. Среди вторичных метаболитов есть пигменты. Некоторые соединения используются в качестве запасных, и из них можно получить недостающие вещества первичного метаболизма. Есть защитные соединения – например, яды, предотвращающие поедание растения. Среди вторичных метаболитов встречается даже функция нападения – некоторые растения выделяют в почву вещества, препятствующие прорастанию семян других растений. И, таким образом, растение избавляется от конкуренции за свет, за питательные вещества почвы. Специальные вторичные метаболиты влияют на поведение насекомых [2].

Функции вторичных метаболитов. В процессе изучения вторичных метаболитов было выдвинуто несколько гипотез о функциональной значимости этих соединений. Однако поразительное разнообразие вторичных метаболитов и практически полное отсутствие корректных подходов к доказательству выдвигаемых гипотез оставляют этот вопрос предметом острых дискуссий до настоящего времени.

Первой появилась гипотеза об отсутствии какой-либо роли вторичных метаболитов в жизни растений. Она существовала со времен А. Косселя, который, собственно, и определил вторичные метаболиты как «нечаянно» синтезируемые растительной клеткой. Исходя из этой гипотезы, вторичные метаболиты считаются «отбросами» жизнедеятельности растений, «тупиками метаболизма», возможно, продуктами детоксикации ядовитых первичных метаболитов (например, свободных аминокислот). В настоящее время подобный взгляд на роль вторичных метаболитов не пользуется успехом и подвергается критике. Основные аргументы «против» — слишком большое количество вторичных метаболитов (растение «могло бы придумать» более рациональные способы утилизации отходов). Кроме того, процесс

вторичного метаболизма слишком хорошо организован во времени и пространстве, чтобы быть «случайным».

Вторая гипотеза утверждала запасующую роль вторичных метаболитов. В ряде случаев концентрация вторичных метаболитов в органах может достигать значительного уровня. Показано, что многие из них действительно утилизируются клеткой: при определенных условиях алкалоиды могут служить источником азота, фенольные соединения — субстратами дыхания. По всей видимости, ряд вторичных метаболитов выполняет эту функцию, однако в большинстве случаев после образования они не реутилизируются, а накапливаются в клетках или специальных структурах, либо экскретируются.

Довольно своеобразной стала гипотеза относительно «первичности» всех вторичных метаболитов. Согласно этому представлению мы просто еще не знаем, в каких важных процессах они участвуют. Исходной точкой для такой идеи было открытие шикиматного пути синтеза ароматических соединений. С его открытием много «типично вторичных» соединений — например, хинная, дегидрохинная, шикимовая кислоты — автоматически перешли в разряд первичных. Очевидно, что если эта гипотеза и справедлива, то лишь для очень немногих веществ, так как основным признаком вторичных метаболитов — не обязательное присутствие в каждой растительной клетке — справедлив для большинства соединений [8].

Наибольшее признание в настоящее время получила гипотеза о защитной роли вторичных соединений. Систему защиты растения от биотических стрессов образно можно представить в виде «кругов обороны» и, в зависимости от опасности патогена, растение последовательно использует соответствующие «круги». Все защитные соединения можно разделить на три группы — конститутивные, полуиндуцибельные и индуцибельные. Конститутивные соединения постоянно присутствуют в тканях и органах растения и относятся к «первому кругу» обороны. Они, как правило, обладают широким спектром активности (антимикробной, фунгицидной, инсектицидной), но уровень активности невысок. Эти

соединения не могут накапливаться в больших количествах, прежде всего из-за своей токсичности, и часто локализуются в мертвых тканях (например, корке) [59].

Полуиндуцибельные соединения находятся в тканях в виде неактивного предшественника и после соответствующего сигнала или воздействия быстро превращаются в активные вещества. Эти соединения часто работают на «втором круге» обороны, образуя соединения, как правило, более токсичны, чем конститутивные. Поскольку предшественник нетоксичен, его концентрация в тканях может быть достаточно высокой. Система получения активного соединения, как правило, основана на компартментации процесса. При нарушении целостности клетки или ткани (за счет прямого повреждения «агрессором» либо в процессе патогенеза) субстрат становится доступным для фермента и быстро образуется токсичное соединение.

Наконец, индуцибельные соединения обычно участвуют в работе «третьего круга» обороны. Они характеризуются очень высокой токсичностью и формируются *de novo* в результате разворачивания процесса патогенеза. Их образование обычно запускается в результате работы сигнальных систем клетки, которые включают гены ферментов их синтеза. Многие вторичные метаболиты являются важнейшими участниками каждого из «кругов обороны» растения.

Среди вторичных метаболитов практически любого класса можно обнаружить конститутивные защитные соединения. Например, монотерпены камфен и мирцен представляют собой инсектициды, ментол и α -пинен — репелленты. Многие дитерпеноиды, входящие в состав смол, обладают бактерицидной и фунгицидной активностью. Гликоалкалоиды пасленовых обладают широким спектром активности. Основная проблема для накопления ощутимых количеств ядовитых веществ — их токсичность для самого растения.

Достаточно часто вторичные метаболиты выступают в роли полуиндуцибельных соединений. В этой системе часто используются

характерные модификации молекул вторичных метаболитов, связанные с изменением их биологической активности. Для них характерно присутствие гликозида в вакуоле, а гидролизующего фермента — в цитоплазме или клеточной стенке. После нарушения целостности тонопласта происходит гидролиз и быстро образуется токсичное или активное соединение — синильная кислота, нитрил или кумарин.

Вторичные метаболиты, участвующие в работе третьего «круга обороны», где происходит индукция синтеза мощных защитных веществ, носят название фитоалексинов. Их образование — важнейшая стадия реакции сверхчувствительности. Фитоалексины никогда не присутствуют в здоровом растении, и их синтез начинается только в ответ на инфекцию.

Фитоалексинами могут быть соединения различных классов вторичных метаболитов. К сесквитерпеноидным фитоалексинам относятся ришитин и любимин (пасленовые, в частности картофель), гемигоссипол (мальвовые), ипомеамарон (вьюнковые), к дитерпеноидным фитоалексинам — касбен (клещевина). Довольно часто фитоалексины представлены фенольными соединениями, такими как стильбены, изофлавоноиды. Последние почти исключительно используются в семействе бобовые.

Таким образом, многие вторичные метаболиты выполняют функции конститутивных, полуиндуцибельных или индуцибельных защитных соединений [59].

Роль вторичных метаболитов в жизни растения далеко не исчерпывается защитными функциями. Хорошо известно, что многие из них активно участвуют в размножении растений. Флавоноиды, прежде всего антоцианы, беталаины, каротиноиды, обеспечивают окраску цветков и плодов, привлекающую опылителей цветков и распространителей семян. Ряд вторичных метаболитов растения могут использовать в качестве «нападающих факторов». Например, находящиеся среди экзометаболитов корней бархатцев тиофены останавливают прорастание семян конкурирующих видов.

В целом можно сказать, что основная функция вторичных метаболитов в растениях — экологическая в широком смысле. Это те биохимические «рычаги», которыми прикрепленный организм — растение — решает множество экологических проблем на протяжении всей своей жизни.

Внутриклеточная локализация. Вторичные метаболиты, как правило, накапливаются в «метаболически неактивных» компартментах клетки — вакуолях и периплазматическом пространстве (клеточной стенке), но синтез их проходит обычно в других компартментах — чаще всего в цитозоле, эндоплазматическом ретикулуме и хлоропластах. Таким образом, в клетке синтез и накопление вторичных метаболитов пространственно разобщены; после синтеза должен происходить их транспорт по секреторному пути.

Места синтеза и накопления вторичных метаболитов различны для разных классов соединений [13]. Алкалоиды накапливаются, как правило, в вакуолях, а в периплазматическое пространство практически не поступают. Транспорт алкалоидов в вакуоли проходит с участием специфичных переносчиков (видимо, ABC-транспортеров). В вакуолях алкалоиды обычно находятся в виде солей. Синтез алкалоидов проходит преимущественно в пластидах (например, хинолизидиновых), либо в цитозоле (чаще всего ЭР).

Изопреноидные вторичные метаболиты, в отличие от алкалоидов, обычно после синтеза выводятся из клетки. Помимо клеточной стенки, они могут иногда накапливаться в вакуолях. Синтез изопреноидов может проходить в двух компартментах — в пластидах или в цитозоле. При этом существуют два независимых пути синтеза изопреноидов: мевалонатный — в цитоплазме, альтернативный — в пластидах.

Фенольные соединения накапливаются как в вакуолях, так и в периплазматическом пространстве. При этом в вакуолях обычно содержатся гликозилированные фенольные соединения, тогда как в периплазматическом пространстве — метаксилированные соединения или агликоны. Синтез фенольных соединений происходит в хлоропластах и цитозоле. Показано

существование двух независимых путей синтеза ароматических соединений (шикиматные пути) — в цитозоле и в пластидах.

Локализация в тканях. Вторичные метаболиты могут быть равномерно распределены по клеткам ткани, однако это бывает достаточно редко. Гораздо чаще они накапливаются в ткани неравномерно, при этом для их локализации могут быть использованы разные структуры. В наиболее простых случаях соединения накапливаются в специализированных клетках — идиобластах. Идиобласты, накапливающие разные вторичные метаболиты, могут иметь характерные особенности. Например, идиобласты, накапливающие алкалоиды у руты (*Ruta graveolens*) содержат большое количество мелких вакуолей. В идиобластах, содержащих танины, вакуоль занимает почти весь объем клетки. Изопреноидсодержащие идиобласты часто характеризуются сильно развитым гладким ЭР. Идиобласты, накапливающие вторичные метаболиты, могут находиться в различных тканях растения, однако чаще всего они присутствуют в покровных тканях.

Довольно часто вторичные метаболиты локализуются в тканях в специализированных структурах — ходах, каналах, млечниках [24]. Эти структуры разделяются на две группы — производные внеклеточного пространства и производные вакуоли. Можно сказать, что на уровне тканей сохраняется «клеточный» принцип накопления вторичных метаболитов — в периплазматическом пространстве и в вакуолях.

Смоляные ходы, камедиевые и масляные каналы (протоки) представляют собой внеклеточные структуры. Млечники, производные вакуолярной системы растений, имеются как минимум у представителей 20 семейств высших растений. Содержимое млечников — латекс — фактически является вакуолярным соком и представляют собой эмульсию, содержащую алкалоиды, изопреноиды и ряд других соединений вторичного и первичного метаболизма.

Таким образом, на уровне тканей можно проследить закономерность, аналогичную клеточной: разделение мест синтеза и накопления вторичных

метаболитов. Установить общие закономерности локализации вторичных метаболитов по органам растений, по-видимому, невозможно. Она зависит от вида растения, условий окружающей среды, типа вторичного метаболита и, вероятно, главное — от его физиологической функции. Вторичные метаболиты могут синтезироваться и накапливаться во всех органах растений [51]. Например, эфирные масла могут накапливаться в лепестках цветков (роза), плодах (анис, кориандр), корнях (валериана, девясил), листьях (мята, шалфей). Сердечные гликозиды могут находиться в листьях (олеандр, наперстянка), коре (обвойник), семенах (строфант), цветках (ландыш).

Достаточно часто вторичные метаболиты выделяются растением в окружающую среду. Для этого существуют различные механизмы и морфологические структуры. Простейшей системой выделения вторичных метаболитов можно считать железистый эпидермис с железистыми пятнами. Железистые пятна используются для выделения эфирных масел и представляют собой его скопления под кутикулой. Образовавшееся эфирное масло скапливается под кутикулой в виде железистого пятна, а затем выделяется в окружающую среду. Такой способ выделения эфирных масел характерен для розы, ландыша, почек тополя.

Более сложными секреторными структурами являются железистые волоски (трихомы) и железки. Они являются достаточно универсальными выделительными структурами и могут использоваться для выделения не только эфирных масел. В различных видах растений они могут осуществлять выделение дитерпеноидов, фенольных соединений и некоторых других вторичных метаболитов. Выделение в наружную среду для алкалоидов не характерно [2].

1.1.2 Флавоноиды растений: разнообразие, значение, особенности накопления

Изучение флавоноидов относится к началу XIX в., когда в 1814 г. Шевроле выделил из коры особого вида дуба кристаллическое вещество,

названное кверцетрином. Спустя 40 лет Риганд установил гликозидный характер этого вещества и агликон назвал кверцетином. В 1903 г. Валяшко установил строение рутина. Систематическое изучение строения природных флавоноидов многие годы проводили польские химики. Большую работу по изучению антоцианов провел Вильштеттер. Исследованиями катехинов занимались А. Л. Курсанов, М. Н. Запраметов, К. Фрейденберг и др. Интерес к флавоноидным соединениям особенно возрос в 40-е годы нашего столетия, флавоноиды привлекают внимание ученых разносторонней биологической активностью и чрезвычайно низкой токсичностью. После 1970 г. выделено свыше 1400 соединений, относящихся к флавоноидам. Перспективным направлением является поиск биологически активных соединений группы ксантонов - близких по строению к флавоноидам.

Флавоноидами называется группа природных биологически активных соединений - производных бензо- γ -пирона (рис. 1.1), в основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из С6-С3-С6 углеродных единиц. Это гетероциклические соединения с атомом кислорода в кольце.

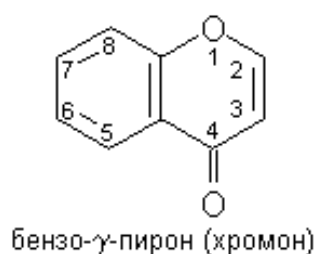


Рис. 1.1 – Структура бензо- γ -пирона.

При замещении в хромоне атома водорода в α -положении на фенильную группу образуется 2-фенил-(α)-бензо- γ -пирон или флавон (рис. 1.2), который состоит из 2 ароматических остатков А и В и трехуглеродного звена (пропановый скелет).

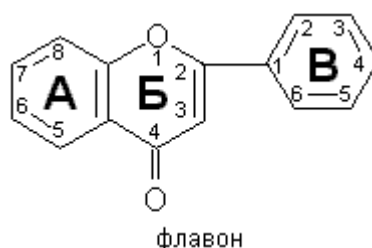


Рис. 1.2 – Структура флавона.

Под термином флавоноиды (от лат. *flavus* - желтый, так как первые выделенные из растений флавоноиды имели желтую окраску, позднее установлено, что многие из них бесцветны) объединены различные соединения, генетически связанные друг с другом, но обладающие различным фармакологическим действием [73].

В зависимости от степени окисления и гидроксирования пропанового скелета С6-С3-С6 и положения фенильного радикала флавоноиды делятся на несколько групп.

Флавоны - бесцветные или слегка желтого цвета, их гидроксированные формы находятся в цветках пижмы, ромашки (флавоны апигенин). Фенильная группа расположена во 2-м положении.

Изофлавоны (рис. 1.3.) – фенильная группа находится в 3-м положении. Содержатся в корнях стельника полевого.

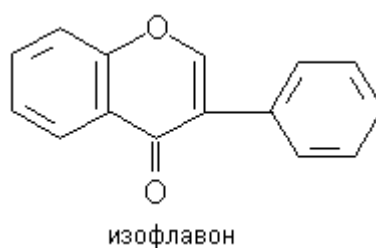


Рис. 1.3 – Структура изофлавоны.

Флавонолы (рис. 1.4) - бледно-желтого цвета. Отличаются от флавонов наличием группы ОН в 3-м положении.

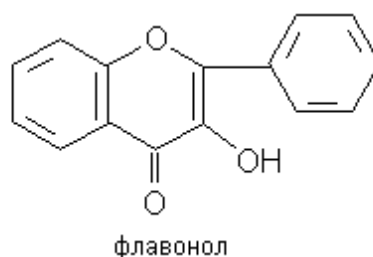
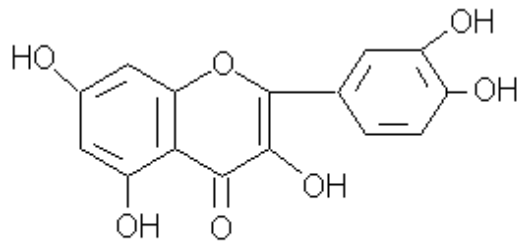


Рис. 1.4 – Структура флавонола.

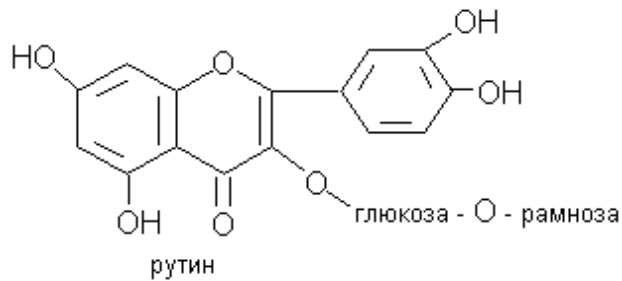
С увеличением количества гидроксильных групп и в зависимости от их положения возрастает густота окраски. Чаще встречаются соединения с 4-5 гидроксильными группами, например кверцетин - 3,5,7,3',4'-пентагидрооксифлавонол (рис. 1.5).



кверцетин

Рис. 1.5 – Структура кверцетина.

Большое значение имеет для медицины гликозид рутин - 5,7,3',4'-тетрагидрооксифлавонол (рис. 1.6). Рутин содержится в гречихе, цветах софоры японской, горцах (перечном, почечуйном, спорыше).

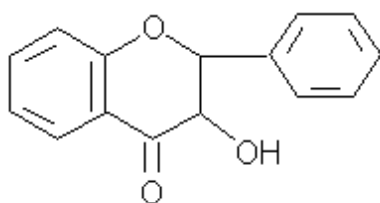


рутин

Рис. 1.6 – Структура рутина.

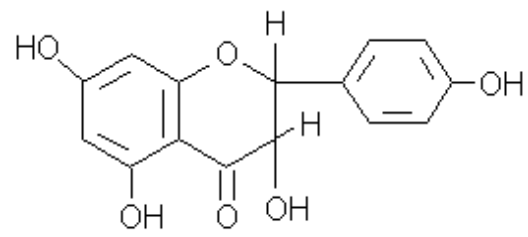
Флавононы (гидрированное производное флавона) в отличие от флавона не имеют двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м положениях [8]. Представителями являются гесперидин (находится в виде гликозида в плодах цитрусовых - лимонах), гликозид ликвиритин (находится в корне солодки и придает ей желтый цвет).

Флавононолы (рис. 1.7) отличаются от флавонола отсутствием двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м положениях. ОН-группа, как и у флавонола, находится в 3-м положении. Скелет флавонола составляет гликозид аромадендрин (рис. 1.8), содержащийся в листьях эвкалипта.



флавононол

Рис. 1.7 – Структура флавононола.



аромадендрин

Рис. 1.8 – Структура аромадендрина.

К флавоноидам относятся производные халкона, катехины, антоцианидины, ауруны. Катехины относятся к полифенолам, входят в состав конденсированных дубильных веществ. Катехины представляют собой наиболее восстановленные флавоноидные соединения. Многие красные и синие окраски цветков с различными оттенками обусловлены присутствием антоцианидинов. В зависимости от рН среды окраска цветков меняется. В кислотной среде они образуют розовую, красную окраску, в щелочной среде - от голубой до синей с разными оттенками. Ауруны имеют разнообразную структуру. Они встречаются в растениях семейства астровых. В растениях присутствуют в форме гликозидов.

Физико-химические свойства. Флавоноиды - кристаллические соединения, бесцветные (изофлавоны, катехины, флавононы, флавононолы), желтые (флавоны, флавонолы, халконы и др.), а также окрашенные в красный или синий цвета (антоцианы). Обладают оптической активностью, имеют определенную температуру плавления, способны к кислотному и ферментативному гидролизу. Гликозиды флавоноидов, содержащие более трех глюкозных остатков, растворимы в воде, но нерастворимы в полярных органических растворителях. Под влиянием света и щелочей легко окисляются, изомеризуются, разрушаются. При нагревании до температуры 200°C эти соединения возгоняются, а при более высокой температуре разрушаются [13].

1.1.3 Влияние экологических и биологических факторов на накопление флавоноидов.

Синтез и накопление вторичных метаболитов зависит от стадии развития растения и его возраста. Наибольшее количество их накапливается у многих растений в фазе цветения, а в фазе плодоношения уменьшается.

В то же время общих закономерностей изменений вторичного метаболизма в онтогенезе, по-видимому, не существует. Разворачивание вторичного метаболизма во времени зависит от вида растения, типа

вторичного метаболита и его физиологической роли и — очень сильно — от внешних воздействий. Например, максимальный уровень накопления многих изопреноидов (эфирных масел, стероидных гликозидов) часто приходится на период бутонизации и цветения. Синтез алкалоидов закономерно разворачивается в процессе онтогенеза. Например, в семенах и всходах мака алкалоидов нет. Через две недели появляется наркотин, а когда проростки достигают в длину 5 — 7 см — кодеин, морфин, папаверин, сангвинарин. К моменту цветения к ним прибавляются тебаин и нарцеин. В млечном соке коробочек мака присутствует уже до 25 алкалоидов. Приведенный пример и целый ряд других фактов показывают, что процесс вторичного метаболизма — четко работающая система, отслеживающая как внутренние факторы (этапы онтогенеза растения), так и внешние воздействия.

Еще больший спектр химической изменчивости наблюдается у растений под влиянием факторов окружающей среды (условий произрастания). Бесспорность влияния условий произрастания на образование и накопление флавоноидов доказана многими исследованиями [51]. Воздействие комплекса внешних условий может выражаться в зависимости количества и состава флавоноидов от места произрастания в определенных географических пунктах.

В литературе есть данные о влиянии техногенного загрязнения на содержание флавоноидов. О.Н. Немерешина и Н.Ф. Гусев установили, что содержание суммы флавоноидов в биомассе растений, произрастающих в зоне действия атмосферных выбросов, превышает количество флавоноидов в биомассе растений контрольных участков [19].

Степень влияния отдельных факторов среды на образование флавоноидов выявлена еще недостаточно, хотя мнение большинства исследователей сходятся в одном: решающим фактором, оказывающим воздействие на эти процессы, служит свет. Светозависимость биосинтеза флавоноидов в растениях проявляется в стимулирующем влиянии света на их количество и качественный состав. Энергичный синтез и накопление

флавоноидов играют защитную роль и являются фактором приспособления растений к неблагоприятным условиям среды.

Для выявления влияния эколого-фитоценологических факторов на накопление флавоноидов ортилии однобокой (*Orthilia secunda* House) - анализу подвергли образцы надземной части растений виргинильного возрастного состояния из 11 популяций ортилии однобокой. Изучение количественного содержания флавоноидных соединений в растениях разных местообитаний показало значительное межпопуляционное варьирование по этому показателю – от 2,52 до 3,39%. При рассмотрении влияния фактора освещенности на содержание флавоноидов ортилии однобокой выявлена несомненная зависимость накопления этих веществ, одной из физиологических функций которых является защита от ультрафиолетовой радиации. Очевидно, что в растениях более освещенных местообитаний суммарное содержание флавоноидов выше, нежели у растений, произрастающих в более затененных условиях. Так, максимальное накопление флавоноидов – 3,39% – отмечено в надземной части ортилии однобокой, произрастающей на открытых участках соснового леса в условиях хорошего освещения, минимальное – 2,52% – у растений, произрастающих в условиях глубокого затенения при высокой сомкнутости крон. Прямая зависимость накопления флавоноидных соединений ортилии однобокой от степени освещенности прослеживается во всех исследованных местообитаниях [33].

Исследовано радиационное воздействие на растение пятилистник кустарниковый (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz). Установлено, что давление радиационного фактора инициирует адаптационные процессы, затрагивающие рост и развитие растений, а также физиолого-биохимическую перестройку метаболических процессов, определяющих существование популяции в пространстве. Экспериментально показано, что при радиационном воздействии усиливается биосинтез общей суммы флавоноидов в листьях пятилистника кустарникового. Установлено, что

содержание флавонолов (в сумме и по группам) в листьях пятилистника кустарникового увеличивается в 2-3 раза по сравнению с контролем, причем с увеличением уровня загрязнения разность с контролем растет. Индивидуальные флавоноидные компоненты формируют разнонаправленные типы ответной реакции организма на радиационное воздействие. Содержание гиперозида, кверцитрина и кемпферола снижается с повышением радиационного загрязнения, содержание остальных флавоноидных компонентов, напротив, возрастает. Качественный состав флавоноидов в листьях облученных и контрольных растений остается постоянным. Обнаружено уменьшение листовой поверхности, снижение прироста годичного побега и черешка листа в длину, увеличение количества листьев на побеге. Обнаружено, что с повышением облучения по большинству критериев различия по сравнению с контролем увеличивались. Разные органы пятилистника кустарникового обладают различной накопительной способностью радионуклидов: в листьях содержание ^{90}Sr выше по сравнению со стеблями независимо от уровня загрязнения, для ^{137}Cs подобной связи не отмечено [52].

Влияние влажности и почвенных микроэлементов. Почва как источник питательных веществ и среда с определенным химическим составом, содержанием воды и микрофлоры, механической структурой имеет важное значение, определенным образом воздействуя на метаболизм растений. Данные литературы свидетельствуют о том, что наибольшее влияние из составляющих эдафического фактора на образование флавоноидов оказывает обеспеченность растений элементами минерального питания. Рядом исследователей выявлено как положительное, так и отрицательное воздействие повышенных количеств фосфора и калия на накопление флавоноидов; также установлено, что дефицит азота в почве стимулирует накопление фенольных соединений, в том числе и флавоноидов [33].

Из числа биологически активных веществ красоднева малого (*Hemerocallis minor Miller*) было определено содержание флавоноидов

как основных действующих веществ данного вида. С помощью хроматографического метода подтверждено наличие кверцетина и рутина в надземных органах красоднева малого. При этом кверцетин превалирует над рутином. Количественный анализ показал неравномерность распределения суммы флавоноидов по органам красоднева и зависимость их содержания от сроков и места сбора растения. При этом в корневищах обнаружены только следы флавоноидов, а наибольшая вариабельность количества флавоноидов определена в листьях [21].

Содержание флавоноидов в листьях красоднева малого, отобранных в одну и ту же дату в 2000, 2001, 2002, 2003 гг. зависит от суммы осадков, выпавших за весенний период. Наблюдается следующая закономерность: чем больше сумма осадков, тем выше содержание флавоноидов. Влияние влажности почвы на содержание флавоноидов было подтверждено результатами их количественного определения.

По полученным данным, накопление и распределение флавоноидов по органам красоднева малого зависит от условий произрастания вида и сроков сбора растения. При этом у красоднева малого, собранного в гигрофильных и мезофильных сообществах, высокое содержание флавоноидов наблюдается во всех органах растения. Наибольшее содержание флавоноидов отмечено во время интенсивного роста вегетативных органов; а в период формирования цветоносного стебля и цветка содержание флавоноидов уменьшается.

Для рационального сбора и использования растительного сырья необходимо применение методов прогнозирования содержания флавоноидов и микроэлементов. Для этого применяют уравнение множественной регрессии Гаусса – Жордана, которое позволяет, используя ряд известных данных, прогнозировать содержание флавоноидов и микроэлементов. Показано, что изменение содержания микроэлементов в почве влияет на содержание флавоноидов в листьях растений.

Используя метод множественной регрессии можно показать взаимосвязь содержания микроэлементов с флавоноидами в органах растений. При

использовании уравнения появляется возможность прогнозировать изменение количества флавоноидов при изменении содержания микроэлементов в листьях растений. Полученные низкие коэффициенты корреляции указывают на невозможность применения данного метода (парной регрессии), так как прямой зависимости содержания одного отдельного микроэлемента с накоплением флавоноидов не установлено. Однако, несомненно, на содержание флавоноидов в растении влияет совокупность микроэлементного состава [21].

1.1.4 Растительное сырье как источник флавоноидов (с учетом экологической безопасности)

Флавоноидосодержащие растения привлекают внимание исследователей вследствие их перспективности в получении лекарственных препаратов широкого спектра действия. Это ценные противовоспалительные, капилляроукрепляющие, желчегонные, противолучевые, противоопухолевые, иммуномодулирующие, антимикробные и иные лечебные средства [57]. В последние десятилетия особый интерес вызывают антиоксидантное действие флавоноидов, их способность купировать свободные радикалы, являющиеся причиной возникновения у человека многих тяжелых патологий, и выводить их из организма [12, 64].

Представителями семейств, растения которых наиболее богаты флавоноидами, являются розоцветные (различные виды боярышников, черноплодная рябина), бобовые (софора японская, стальник полевой, солодка), гречишные (различные виды горцев - перечный, почечуйный, птичий; гречиха), астровые (бессмертник песчаный, сушеница топяная, пижма), яснотковые (пустырник сердечный) и др. Часто флавоноиды встречаются в тропических и альпийских растениях. Обнаружены и у низших растений: зеленые водоросли (ряски), споровые (мхи, папоротники), хвощи (хвощ полевой), а также у некоторых насекомых (мраморно-белая бабочка). Находятся флавоноиды в различных органах, но чаще в надземных: цветках, листьях, плодах; значительно меньше их в стеблях и подземных органах

(солодка, шлемник байкальский, стальник полевой). Наиболее богаты ими молодые цветки, незрелые плоды. Локализуются в клеточном соке в растворенном виде. Содержание флавоноидов в растениях различно: в среднем 0,5-5% (Табл. 1), иногда достигает 20% (в цветках софоры японской). В растениях флавоноиды встречаются в виде гликозидов и в свободном виде [73].

Таблица 1. Содержание флавоноидов в некоторых растениях.

	Содержание кверцетина
Яблоки	44 мг/1 кг
Красный лук	1810 мг/1кг
Красный виноград	158 мг/1кг
Томат	158 мг/1кг
Капуста брокколи	158 мг/1кг
Малина	158 мг/1кг
Голубика	158 мг/1кг
Брусника при выращивании	74 мг/1кг
Брусника дикая	146 мг/1кг
Клюква при выращивании	83 мг/1кг
Клюква дикая	121 мг/1кг
Черноплодная рябина	89 мг/1кг

1.2 Пигментный аппарат растений и его особенности в зависимости от условий произрастания.

Общая характеристика пигментного аппарата. Поглощение и трансформация солнечной энергии в процессе фотосинтеза осуществляется фотосинтетическими пигментами растений, в частности, хлорофиллами и каротиноидами. Хлорофилл содержит четыре соединенных между собой остатка пиррола, которые образуют порфириновое ядро. Оно связано двумя

основными и двумя дополнительными валентностями с атомом магния. Специфическое строение молекулы хлорофилла позволяет даже при незначительном количестве энергии (около 1 кванта) переходить в возбужденное состояние, т.е. повышать свой энергетический уровень и способность к реакциям.

Хлорофилл можно экстрагировать из листьев и разделить на фракции соответственно двум несколько различающимся формам. Одна из них известна как хлорофилл *a* и имеет химическую формулу $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, другую называют хлорофилл *b* и его формула $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$. Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* тем, что у второго пиррольного остатка вместо метильной группы $-CH_3$ содержится формильная $O=C-H$.

Количество и соотношения пигментов зависят от вида растений, внешних условий и возраста листьев [45]. Как правило, хлорофилла в листьях приблизительно в 3 раза больше, чем каротиноидов. Общее количество хлорофилла широко варьирует у разных видов, некоторые из которых содержат в два или три раза больше хлорофилл на единицу сухой массы листьев, чем другие. Обычно на три части хлорофилла *a* приходится одна часть хлорофилла *b*. Изменения количества хлорофиллов можно проследить у одного и того же растения. Например, осенью в листьях, подвергнутых действию водного стресса, хлорофилл *a* разрушается быстрее хлорофилла *b*. Из этих двух форм хлорофилл *a*, по-видимому, более эффективен для процесса фотосинтеза. Роль хлорофилла *b* ограничивается передачей захваченной энергии на хлорофилл *a*.

Поглощение энергии хлорофиллами происходит в красной и синей части солнечного спектра, при этом максимальное поглощение для хлорофилла *a* наблюдается при длине волны 430 и 663 мкм, а хлорофилла *b* — 450 и 645 мкм. В морских водорослях найдены две другие разновидности хлорофилла — *c* и *d*, а у некоторых бактерий, способных осуществлять фотосинтез, обнаружены еще два типа хлорофилла. Во всех растениях, кроме водорослей

и фотосинтезирующих бактерий, хлорофилл содержится в хлоропластах клеток.

В процессе фотосинтеза немаловажную роль играют каротиноиды, особенно, каротины и ксантофиллы, которые поглощают солнечную энергию и посредством хлорофилла *a* передают в центр фотохимических реакций листа. Каротиноиды выполняют также защитные функции, в частности, предотвращают деструктивное фотоокисление органических соединений протоплазмы на свету, в присутствии свободного кислорода.

Многочисленными исследованиями доказана важная роль концентрации фотосинтетических пигментов в формировании урожая и накоплении биоэнергии растений в агроэкосистемах. Она, очевидно, имеет еще большее значение для экосистем, где растения постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных почвенно-климатических условий и антропогенному прессингу [36].

Влияние экологических факторов на содержание хлорофилла. Первым крупным исследованием пигментной системы в экологическом аспекте были работы В.Н.Любименко. На основании измерений содержания хлорофилла в листьях более 60 видов растений из различных точек земного шара была установлена закономерность: у растений светолюбивых количество хлорофилла уменьшается, а у тенелюбивых увеличивается при движении от полюсов к экватору.

Изучение поведения пигментного фонда растений в онтогенезе, а, следовательно, и в зависимости от основных факторов внешней среды имеет особую ценность, так как создает возможность воздействия на фотосинтетическую продуктивность через ее основу – пигментный аппарат [3].

Постоянное присутствие в атмосфере промышленных регионов фитотоксичных примесей приводит к необходимости формирования у растений такой структуры листа, которая позволяет сохранить относительное равновесие фотосинтетического аппарата. В процессе адаптации участвуют

многие параметры, однако ведущим звеном следует считать изменение фотоактивной поверхности, регулируемой либо числом хлоропластов, либо их размерами, а следовательно, и концентрацией пигментов в фотосинтетических мембранах. Понижение содержания зеленых пигментов в основном сопровождалось торможением биосинтеза и накоплением хлорофилла *b*. Изменяется и соотношение хлорофилла *a* к *b* [71].

Под влиянием промышленных эмиссий у некоторых видов наблюдается тенденция к формированию в этих условиях ксероморфной структуры листа, которая характеризуется повышенным содержанием хлорофилла в ассимиляционном аппарате, у других, наоборот, мезоморфной с пониженным содержанием хлорофилла [14]. Также физиологическая адаптация может проявиться в увеличении содержания хлорофиллов *a* и *b* по сравнению с контролем [53].

Показано, что концентрация хлорофилла линейно зависит от времени освещения при постоянной интенсивности, так и от количества света. Так, уменьшение продолжительности суточного освещения с 14 до 10 часов увеличило содержание хлорофилла в листьях дуба до максимальных величин, а дальнейшее укорочение длины дня при той же освещенности привело уже к снижению количества хлорофилла [50].

Таким образом, большинство исследователей придерживаются мнения, что существует определенная зависимость содержания пигментов пластид от интенсивности света. Как правило, при уменьшении интенсивности освещения повышается количество хлорофилла и его доля в суммарном содержании пигментов. Содержание каротиноидов при этом обычно понижается. Однако нельзя полностью отделить влияние светового фактора от влияния других условий на содержание пигментов.

Вопрос о влиянии температуры на содержание пигментов пластид нельзя рассматривать без учета влияния светового фактора, а также физиологического состояния растений, фазы их развития, условий, предшествующих отбору образцов для анализа и т.п.

Влияние водного режима. У мезофитов наблюдается большее содержание воды и большее содержание хлорофиллов (при расчете на сырой вес листьев), у ксерофитов меньшему содержанию воды соответствует и меньшее количество хлорофиллов. Среди отдельных видов растений колебания весьма значительны. Была обнаружена прямая зависимость между содержанием хлорофиллов и водоудерживающей способностью в листьях древесных растений [9]. Таковы основные результаты работ по действию различных факторов на содержание пигментов в листьях растений. Эти результаты не всегда однозначны, что в значительной мере связано, с невозможностью вычленивать действия различных факторов.

Таким образом, содержание биологически активных соединений в растениях может использоваться как тестирующий признак для биоиндикации состояния почв и атмосферного воздуха на предмет загрязнения промышленными поллютантами.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1 Характеристика объекта исследования

Марь белая, или Марь обыкновенная (*Chenopodium album*) — быстрорастущее сорное однолетнее травянистое растение, вид рода Марь (*Chenopodium*) семейства Маревые (*Chenopodiaceae* Vent.). Несмотря на то, что растение в некоторых регионах культивируется как продовольственное, во многих местах оно считается сорняком. Растение широко распространено по всему миру, на территории России от Арктики до высокогорных районов на юге. Обычное рудеральное растение в Средней России.

Сильно ветвистое, достигающее в высоту более одного метра. Стебель прямостоячий, часто с пурпурной окраской у корня, ветвящийся, бороздчато-полосатый. Листья очерёдные вытянутые яйцевидно-ромбической формы с зубчатыми краями или неглубоко лопастные, длина листа почти вдвое больше ширины [44]. Часто покрыты мучнистым налётом с обеих сторон. Мучнисто-белый налет на растении образуется за счет особых пузыревидных (полых изнутри) волосков, которые защищают марь от перегрева и потери влаги, т.к. большинство представителей семейства обитают на засоленных почвах и засушливых местах [68]. Цветки обоеполые небольшого размера радиально симметричные образуют плотные колосовидные соцветия собранные в метёлку длиной 10—40 см. Цветение происходит во второй половине лета и длится до начала осени. Плод – односемянной блестящий чечевицеvidный орешек. На одном растении вызревает до 100 000 семян, которые, легко осыпаясь, сильно засоряют территорию. Благодаря водонепроницаемой оболочке могут долго находиться в почве до наступления благоприятных условий. При массовом прорастании могут нанести заметный ущерб посевам культурных растений.

Применение. В аридных регионах Сибири виды рода *Chenopodium*, в том числе и марь белую, используют в качестве топлива, сырья для красителей и поташа, употребляют также как кормовые растения и в пищу [43]. Зелёные части растения пригодны для корма скота в составе кормовых

смесей, или на пастбищах. Семена обладают существенным кормовым значением, после обработки пригодны для использования на корм скоту. Растения мари белой содержат разнообразные и значительные количества питательных веществ, а именно: липидов, жирных кислот и каротина, витамина С (155 мг/100 г), жирных кислот (45,33%), каротиноидов (12,5 мг/100 г), щавелевой кислоты, минеральных элементов (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn и Mn). Известно об использовании растения в народной медицине [69]. Восточная медицина Тибета, Индии, Китая, а также латиноамериканская и европейская народная медицина широко применяют его как антигельминтное, антиканцерогенное, противовирусное, биоцидное, протистоцидное, фунгицидное, тонизирующее, диуретическое, гипотензивное средство, а также при желудочно-кишечных расстройствах, артритах, кожных заболеваниях [56]. В настоящее время стало очевидным, что многие из указанных возможностей лечебного применения видов мари обусловлены наличием в них флавоноидов. Именно с флавоноидами связывают гипотензивный эффект мари белой.

Chenopodium album значительно варьирует в природе, в связи с чем таксономия его достаточно сложна. Однако, как было показано [63], этот вид и его родственные гексаплоидные таксоны характеризуются одним и тем же флавоноидным профилем, что свидетельствует в пользу того, что существует один вид.

2.2 Сбор растительного сырья и подготовка образцов для анализа

Были выбраны 7 участков сбора растительного сырья (Приложение 3).

Таблица №2. Участки сбора растительного сырья

№ участка	Участки сбора растительного сырья (Марь белая <i>Chenopodium album</i> L. Семейство: Маревые <i>Chenopodiaceae</i>)	Дата сбора
1	РТ, В.Услон, садово-огородный участок (условный контроль)	15.07
3	РТ, В.-услонский район, площадка для хранения пескосоляной смеси (технической соли)	17.07

4	РТ, В.Услон, обочина дороги вдоль берега Волги	01.08
5	РБ, пос. Бол.Куганак, территория между железной дорогой и насыпной автодорогой	10.08
6	РБ, пос. Бол.Куганак, Стерлитамакский завод нефтеспецматериалов	10.08
7	РБ, п.Бол.Куганак, Стерлитамакский кирпичный завод	10.08
8	РБ, г. Стерлитамак, Стерлитамакские биологические очистные сооружения (БОС)	12.08

Собирали надземную массу в фазе цветения-плодоношения (в фазу наибольшего накопления флавоноидов). Отбор производился с площади 10x10 м, выделяя по 4 площадки 1x1 м. Отбирали листья среднего яруса.

Сушка растительного сырья проводится сразу после сбора, так как в нем содержится большое количество влаги. Для сушки растительное сырье рассыпают тонким слоем так, чтобы на один квадратный метр приходилось не более 1 – 2 кг сырья. Чтобы оно сохло быстрее и не согревалось, его чаще переворачивают. Рассыпать растения необходимо на какой-нибудь чистой подстилке. Лучше всего лекарственное сырье сушить в хорошо проветриваемых помещениях [27].

Все виды лекарственного сырья лучше сушить под открытым навесом, где имеется хорошая вентиляция и на сырье не падают прямые солнечные лучи, а также в закрытых помещениях с вентиляцией.

Самым «сберегающим» служит способ глубокого замораживания и высушивания в вакууме. Полученный таким способом растительный материал далее пригоден к длительному хранению. В тех случаях, когда основная цель исследования состоит в точной количественной оценке содержания флавоноидов, целесообразно применять быстрое замораживание растительного материала жидким азотом сразу после его сбора.

1) Отбор и предварительная подготовка проб. Необходимо следить за однородностью сырья по способу подготовки (цельное, измельченное, прессованное и т.д.), цвету, запаху и засоренности. Учитывать и по возможности устранять наличие плесени, гнили, устойчивого постороннего

запаха, не исчезающего при проветривании; засоренность ядовитыми растениями и посторонними примесями (камни, стекло, помет грызунов и птиц и т.д.).

2) Измельчение. Сырье измельчают в фарфоровой ступке или на электрической кофемолке до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

3) Отбор аналитических проб для определения влажности и содержания флавоноидов. Аналитические пробы отбирают методом квартования. Для этого сырье помещают на гладкую, чистую, ровную поверхность, перемешивают, разравнивают, по возможности тонким, равномерным по толщине слоем в виде квадрата, и по диагонали делят на четыре треугольника. Два противоположных треугольника удаляют, а два оставшихся соединяют, осторожно перемешивают, разравнивают в виде квадрата, вновь делят по диагонали и удаляют следующие два треугольника. Так повторяют до тех пор, пока в двух противоположных треугольниках не останется количество сырья, соответствующее массе аналитической пробы (5 г). Аналитические пробы должны быть отобраны с погрешностью не более 0.01г [16].

Определение влажности растительного сырья производится согласно ГОСТ. Основан данный метод на определении потери в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ при высушивании сырья до абсолютно сухого состояния [17]. Берут две навески (аналитические пробы) сырья массой по 3-5 г (точная навеска), взвешенные с погрешностью не более 0.01 г. Каждую навеску помещают в предварительно взвешенный и пронумерованный тигель. В сушильный шкаф, нагретый до 100-105°C, быстро помещают подготовленные тигли с навесками. При этом температура в шкафу падает. Время, в течение которого сырье должно сушиться, отсчитывается с момента, когда температура в шкафу достигает 100-105°C. Высушивание проводят до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями

после 30 минут высушивания и 30 минут охлаждения в эксикаторе не превышает 0.01 г.

Первое взвешивание семян и плодов проводят через 3 часа, а трав и цветков – через 2 часа. Тигли с навесками вынимают из шкафа тигельными щипцами и помещают на 30 мин для охлаждения в эксикатор, на дне которого находится концентрированная серная кислота. Охлажденные тигли взвешивают.

Проводят два параллельных определения.

Влажность сырья (X) в процентах вычисляют по формуле (2.1):

$$X = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m} \quad (2.1)$$

где, m – масса сырья до высушивания, г;

m₁ – масса сырья после высушивания, г.

Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 0.5%. Влажность лекарственного сырья не должна превышать 13% [74].

В исследованных нами образцах влажность составляла 6-9%.

Экстрагирование. Для флавоноидов, как и для других веществ, не существует способа выделения, универсального для всех растительных материалов. В каждом конкретном случае прибегают к наиболее подходящему методу или сочетанию методов, с учётом в основном свойств веществ и особенностей растительного сырья. Наиболее часто используются избирательная экстракция, осаждение с помощью солей тяжёлых металлов и хроматографические методы [26].

Приготовление экстрактов. Нами были проанализированы различные литературные источники по подбору условий проведения экстрагирования (вид экстрагента, его концентрация, соотношение сырье:экстрагент, степень измельчения сырья, время экстракции). При этом основным критерием выбора являлось содержание суммы флавоноидов в экстракте в пересчете на рутин [12].

Нами были испытаны два способа экстракции (табл.3):

1. Ступенчатая трехкратная экстракция с нагреванием;
2. Однократная экстракция при комнатной температуре (настаивание).

Таблица 3. Эффективность извлечения флавоноидов при разных способах экстракции.

№ образца	Содержание флавоноидов, % на сухую массу	
	Экстракция с нагреванием	Экстракция настаиванием
1	2,25	3,29
2	1,85	2,18
5	5,07	6,57
6	4,93	5,82
8	5,59	7,88

Из таблицы видно, что во всех исследованных образцах эффективность экстракции была выше при настаивании. В литературе также есть указания об использовании этого метода.

Для получения экстракта травы мари белой был применён классический метод экстрагирования – настаивание. Аналитическую пробу 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 70% спирта этилового и настаивали в течение 24 часов.

В таблице 4 представлены условия получения экстракта из исследованных нами образцов.

Таблица 4. Условия проведения экстрагирования биологически активных веществ из листьев мари белой.

Кратность экстрагирования	Степень измельчения сырья	Вид экстрагента	Концентрация экстрагента	Соотношение сырье – экстрагент	Время экстракции
1	1,0 мм	Водный раствор этанола	70%	1:100	24 ч

Спиртовые извлечения листьев мари белой фильтровали через бумажный беззольный фильтр и помещали в прохладное место. В результате получили прозрачное извлечение темно-зеленого цвета с характерным запахом спирта этилового и ароматическим запахом листьев мари белой [31].

2.3 Методика количественного определения суммы флавоноидов в растительном сырье спектрофотометрическим методом

При оценке качества растительного сырья и фитопрепаратов, содержащих флавоноиды, наибольшее распространение получил спектрофотометрический метод анализа, основанный на использовании реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом. Количественное определение флавоноидов проводили по методике, основанной на методе В.В. Беликова [6]. Фотометрический метод определения без предварительного разделения компонентов основан на аддитивности значений оптической плотности всех компонентов смеси при одной длине волны. Метод достаточно прост в исполнении, является высокочувствительным и относительно недорогим, что делает его предпочтительным для использования в контрольно-аналитических лабораториях. Использование такого метода позволяет определить сумму флавоноидов в присутствии других полифенольных соединений, не образующих комплекса с алюминием хлорида в среде 30-96% спирта.

В качестве стандарта используется тот флавоноид (рутин, кверцетин, гесперетин и т.д.), максимум поглощения комплекса которого наиболее соответствует максимуму поглощения комплекса с хлоридом алюминия исследуемого образца. В нашей работе в качестве стандарта использовался ГСО рутина, так как при измерении оптической плотности в интервале 408–616 нм максимум поглощения был зафиксирован в области 408–420 нм [32].

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре ПЭ - 5300ВИ в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Оборудование, материалы и реактивы:

- мерная колба объемом 100 см^3 – 1 шт.;
- мерные колбы объемом 25 см^3 – 6 шт.;
- пипетки объемом 1 см^3 – 3 шт.;
- пипетки объемом 5 см^3 – 1 шт.;
- мерный цилиндр объемом 100 см^3 ;
- часы;
- кюветы на 10 мм;
- спектрофотометр ПЭ - 5300ВИ;
- алюминия хлорид 5%;
- спирт этиловый 70%;
- спирт этиловый 95%.

Подготовка к анализу включает приготовление 5%-го раствора алюминия хлорида: 5 г алюминия хлорида х.ч. или ч.д.а. (ГОСТ 3759-75) растворяют в 50 мл 95% спирта в мерной колбе на 100 мл, доводят объем раствора этим же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 месяца.

Устойчивое окрашивание спиртового раствора густого экстракта с хлоридом алюминия наступает через 30 мин и сохраняется в течение 1,5 ч, что достаточно для проведения анализа.

Приготовление 70%-го этилового спирта: для приготовления 1 л 70% этилового спирта смешивают 675 г этилового спирта 95% и 325 г воды. В объемных единицах: 95% этилового спирта – 855 см^3 , воды – 325 см^3 . После приготовления раствора проверяют его плотность или объемную долю спирта ареометром (ГОСТ 3639-79) [18].

Приготовление раствора рутина: ГСО рутина массой 0,05 г перенесли в мерную колбу объемом 50 мл, прилили 40 мл 70%-ного спирта, нагрели на водяной бане до растворения рутина. Остудили до комнатной температуры и довели до метки 70% спиртом.

Для построения калибровочного графика зависимости оптической плотности от количества рутина в растворе было приготовлено две серии растворов – опытные и растворы сравнения. Для этого в мерную колбу 25 мл переносили по 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 мл раствора рутина. При этом количество рутина в 25 см³ спектрофотометрируемого раствора равно соответственно: 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 мкг/25см³. Для калибровочной кривой пересчитывали содержание в мкг/1см³: 8,0; 16,0; 24,0; 32,0; 40,0; 48,0.

Приливали в каждую пробу по 4 мл раствора хлорида алюминия, взбалтывали, доводили до метки 70% спиртом, получая растворы с комплексным соединением со П₁ по П₆.

Приготовление раствора сравнения. Для этого в мерную колбу 25 мл последовательно переносили по 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 мл раствора рутина, доводили до метки 70% спиртом, получая растворы сравнения с I₁ по I₆.

На спектрофотометре ПЭ - 5300ВИ при длине волны 415 нм получили следующие результаты:

Концентрация раствора рутина, мкг/см ³	8,0	16,0	24,0	32,0	40,0	48,0.
Оптическая плотность	0	0	0,113	0,192	0,295	0,373

Построили калибровочный график (рис. 2.2).

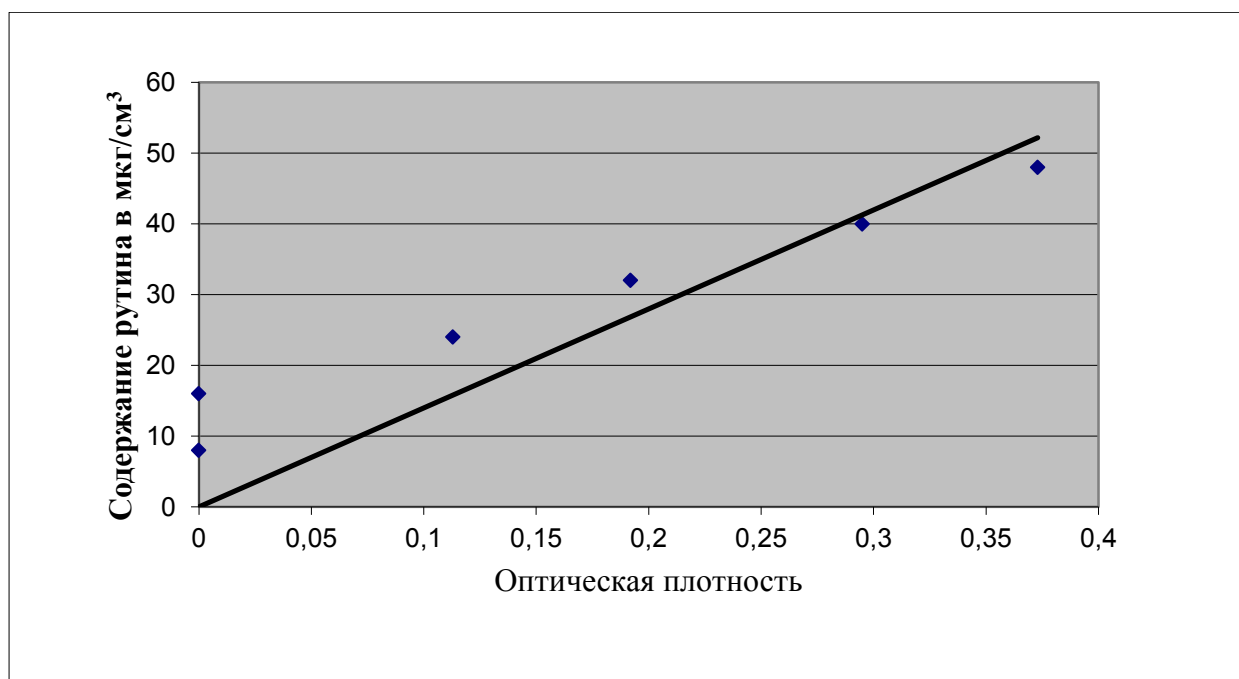


Рис. 2.2 Зависимость оптической плотности от количества рутина в растворе

Получено уравнение $Y(\text{мкг/мл})=139,82 \cdot X$. Коэффициент, полученный из уравнения линейной зависимости, использовали в дальнейшем для расчета содержания рутина в наших образцах.

Для определения содержания флавоноидов в опытных образцах готовили две серии образцов (с хлоридом алюминия и без него (растворы сравнения), т.е. применяли дифференциальный вариант спектрофотометрии, который позволяет исключить влияние на результаты анализа сопутствующих веществ [31]). Расчет содержания рутина (мкг/см^3) проводили с помощью коэффициента пересчета (см.выше).

Расчет содержания флавоноидов в растительном сырье проводили по формуле (2.3):

$$X(\% \text{ отвоздушно} - \text{ сухой массы}) = \frac{Y \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{M \cdot V_3 \cdot 10^6}, \quad (2.3)$$

где: Y - содержание рутина в мкг/1 см^3 ;

V_1 - общий объем экстракта, мл;

V_2 - объем разведения (в нашем случае 25 мл);

V_3 – объем экстракта, взятый для анализа, мл;

M – масса воздушно-сухого сырья, г;

10^6 – пересчет мкг в г;

100 – пересчет в %.

Ошибка определения составляет 0,4 % [12].

2.4 Количественное определение пигментов

Для определения количественного содержания хлорофиллов использовали спектрофотометрический метод. Измерение оптической плотности экстрактов опытных образцов проводили на спектрофотометре ПЭ - 5300ВИ при длине волны 665 нм - для хлорофилла *a*, при длине волны 649 нм – для хлорофилла *b* в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 70% водный раствор этанола.

Определяли концентрации хлорофиллов a и b в общей смеси пигментов по формулам (2.4; 2.5):

$$C_a = 13,70 \cdot A_{665} - 5,76 \cdot A_{649} \quad (2.4)$$

$$C_b = 25,80 \cdot A_{649} - 7,60 \cdot A_{665} \quad (2.5)$$

Установив концентрацию пигмента в вытяжке, определили его содержание в исследуемом материале с учетом объема вытяжки и массы пробы по формуле (2.6):

$$F = \frac{C \cdot V}{1000 \cdot P}, \quad (2.6)$$

где F – содержание пигмента в растительном материале, мг/г сырой массы;

C – концентрация пигментов, мг/л;

V – объем вытяжки пигментов, мг/л;

P – навеска растительного материала, г.

Определив содержание пигментов, вычислили их сумму и отношение a/b .

При обработке результатов количественных анализов использовали методы математической статистики согласно рекомендациям [1, 18]. Статистическую обработку данных [24] проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 (Приложения 1, 2).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Оценка экологических условий в точках сбора растительного сырья

Дана экономико-географическая характеристика территорий.

Верхнеуслонский район находится в северо-восточной части Приволжской возвышенности, на правобережье Волги и ее притока Свияги. Через Верхнеуслонский район проходят 2 автомобильные трассы федерального значения: Казань – Москва, Казань - Ульяновск. По своим природно-климатическим условиям Верхний Услон характеризуется умеренным климатом и переходом почвенно-растительных зон от леса к степи. Почвы глинистые, рельеф в основном волнисто-равнинный, с обрывами и долинами рек, многочисленными оврагами и балками. Из полезных ископаемых имеются известняки, глины, доломиты, пески и песчаники. Район сельскохозяйственный, ведущими отраслями являются молочное и мясное животноводство, выращивание зерновых и кормовых культур [66].

Территория Стерлитамакского района входит в пределы Прибельской увалисто-волнистой равнины. По территории района протекает река Белая с притоками Ашкадар, Стерля, Куганак. Район пересекает железная дорога Уфа-Оренбург, автомобильные дороги Уфа-Оренбург, Раевский-Стерлитамак-Белорецк, Стерлитамак-Стерлибашево, Стерлитамак-Федоровка. Климат теплый, засушливый. В поймах рек произрастают осокоревые и ольховые леса с примесью дуба, липы и вяза, занимающие 5,1% территории района. Распространены чернозёмы выщелоченные и типичные, тёмносерые слабоподзоленные почвы. Полезные ископаемые представлены месторождениями нефти, поваренной соли, известняка, цементной глины, гипса, глины тугоплавкой, глины керамзитовой, кирпичного сырья, песчано-гравийной смеси. Район промышленно-сельскохозяйственный [72].

Дана оценка уровня техногенной нагрузки по количеству и характеру предприятий (табл.5).

Таблица 5. Сравнение предприятий Верхнеуслонского и Стерлитамакского районов

Предприятия Верхнеуслонского района	Предприятия Стерлитамакского района
Филиал ОАО "Булочно-кондитерский комбинат"	ОАО Стерлитамакский хлебокомбинат
Молочный завод ООО Агрофирма "Верхний Услон"	ОАО "Стерлитамакский молочный комбинат"
Кураловское подразделение по производству квасного сула и патоки мальтозной ОАО "Таткрахмалпатока" (с. Куралово)	ОАО Комбинат пивобезалкогольных напитков "Шихан"
Филиал ОАО "Вамин Татарстан" - "Печищинский КХП"	Стерлитамакский кожевенно-обувной комбинат
ОАО "Флодово-ягодный совхоз "Шеланговский"	ООО «Стерлитамакский завод нефтеспецматериалов»
ООО "Дивный берег" по производству рыбной продукции	Стерлитамакский кирпичный завод
ГБУ "Приволжсклес"	Стерлитамакское открытое акционерное общество "Каустик"
Филиал ОАО Тростовая компания "Татагрохимсервис"	ОАО «Сода»
Матюшинский карьер по добыче щебня и известковой муки	ООО «Асфальтобетонный завод»
Филиал ЗАО "ФОН" - "Ключищинская керамика"	ОАО «Известковый завод»
Кирпичный завод ООО "Керамика-Синтез" (с. Шеланга)	ЗАО "Стерлитамакский Нефтехимический Завод"

Из таблицы 5 видно, что в Стерлитамакском районе преобладают промышленные предприятия химической и нефтехимической направленности, тогда как в Верхнеуслонском – предприятия пищевой промышленности, сельское хозяйство. По количеству населенных пунктов (рис. 3.1) также лидирует Стерлитамакский район. Причем доля сельских поселений была приблизительно одинакова, следовательно, в Стерлитамакском районе преобладает доля городских поселений, где выше уровень загрязнения от предприятий и автотранспорта. Таким образом, общая техногенная нагрузка района повышается.

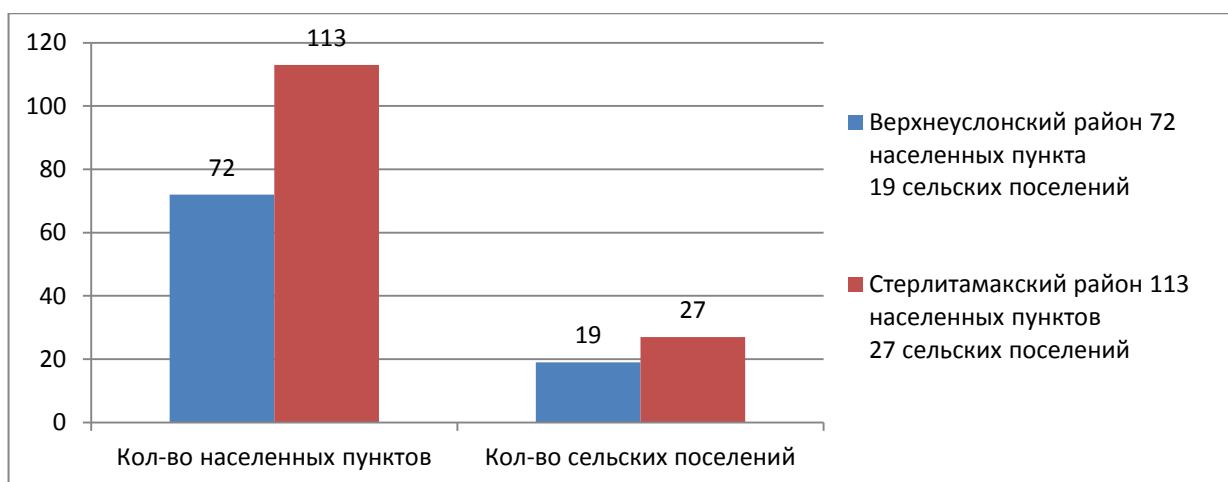


Рис. 3.1 Сравнение количества населенных пунктов и сельских поселений

Как известно по данным СМИ, в Верхнеуслонском районе периодически проводятся санитарно-экологические двухмесячники по очистке территорий муниципальных районов в целях обеспечения санитарно-экологического благополучия территории республики. Кроме того, данный район в перспективе может стать зоной экологического туризма, благодаря преимуществам географического положения, природного окружения и близости историко-культурных памятников [70].

Стерлитамакский район республики Башкортостан также обладает большим потенциалом в направлении развития экологического туризма. Это обуславливается богатым растительным и животным миром, а также наличием природных и исторических памятников. Однако наряду с положительными моментами были выявлены проблемы, препятствующие развитию туризма:

- Высокая степень антропогенного воздействия на территорию;
- Высокая пожароопасная обстановка;
- Последствия поисково-разведочных и эксплуатационных работ на нефть и газ;
- Наличие нефтяных озер;

По данным Министерства природы РФ о состоянии окружающей среды, в Башкирии самым загрязненным городом является Стерлитамак, а на втором месте после него – Уфа. Несколько по-другому выглядит это соотношение в

российских масштабах – в рейтинге топ-100 самых загазованных городов РФ Стерлитамак занял 28, а Уфа – 79 место. Помимо этого, Башкирия отметилась и в перечне республик с самым большим выбросом вредных веществ от автотранспорта, 8-е место по России. Известно также, что все расчеты составлялись с опорой на данные, принятые в Евросоюзе. Среди наиболее часто встречающихся вредных веществ ученые выделили бензапирен, формальдегид и взвешенные вещества. Значительная часть выбросов вредных веществ (более 50%) приходится на долю предприятий нефтехимического комплекса. Около половины всех выбросов составляет сернистый ангидрид, 32% – углекислота, 4% – твердые частицы, кроме того, присутствует уксусная кислота, фенол, аммиак и другие вещества. Наибольшая концентрация вредных выбросов наблюдается в крупных промышленных узлах – Уфе, Салавате, Стерлитамаке и Ишимбае.

Несмотря на проводимые мероприятия по улучшению экологической обстановки в регионе, рассматриваемая территория относится к градации III, что соответствует загрязнению высокому и неблагоприятному для здоровья, индексу загрязнения атмосферы, равному 10 [67].

В перечне 100 самых загрязненных городов с населением 100 и более тысяч жителей в плане качества воздуха находятся три города Татарстана: Нижнекамск (26-е место), Набережные Челны (32-е место) и Казань (61-е место). Экологическую обстановку в Республике Татарстан определяют предприятия теплоэнергетического комплекса и нефтяной промышленности, химические, нефтехимические и машиностроительные производства, строительный комплекс и сельское хозяйство. Существующая структура промышленности, устаревшие технологии формируют в республике широкий круг природоохранных проблем и резко обостряют экологическую обстановку. Удовлетворительная экологическая обстановка, по данным Института экологических проблем РТ, характерна для территорий, где проживает 10% населения. 43% населения республики проживает на территории с тяжелой и тревожной экологической ситуацией, 47% - на

территории с умеренно-напряженной и напряженной экологической обстановкой. В целом, Верхнеуслонский район можно отнести к территориям с удовлетворительной экологической обстановкой.

Нами была дана характеристика погодных условий в точках сбора растительного сырья. Для этого: проведен сравнительный анализ средних дневных и ночных температур между двумя территориями (рис. 3.2).

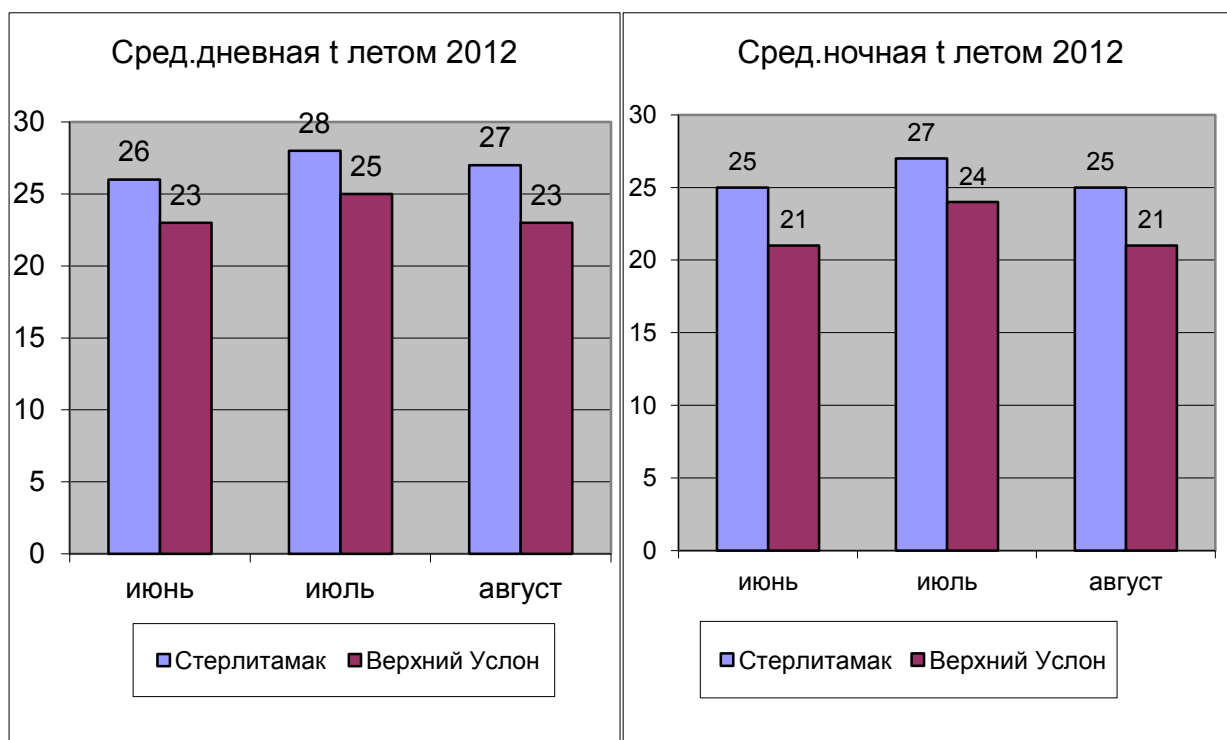


Рис. 3.2 Показатели средних дневных и ночных температур в летние месяцы 2012 года в регионах отбора образцов.

По диаграмме видно, что в течение трех летних месяцев как дневные, так и ночные температуры были выше в Стерлитамакском районе на 3-4 °С, причем ночная была на 1°С выше, чем дневная (т.е. ночи в Стерлитамакском районе были теплее, чем в Верхнеуслонском). Можно предположить, что осадков в Стерлитамакском районе было меньше, а интенсивность солнечного излучения - выше. С другой стороны, известно (см. раздел 2.1), что марь белая – это растение, которое хорошо приспособлено к произрастанию на засоленных почвах и засушливых местах и имеет приспособления, защищающие ее от перегрева и потери влаги.

Таким образом, выбранные нами участки значительно различались как по уровню техногенной нагрузки, так и по погодным условиям.

3.2 Влияние условий произрастания на содержание флавоноидов

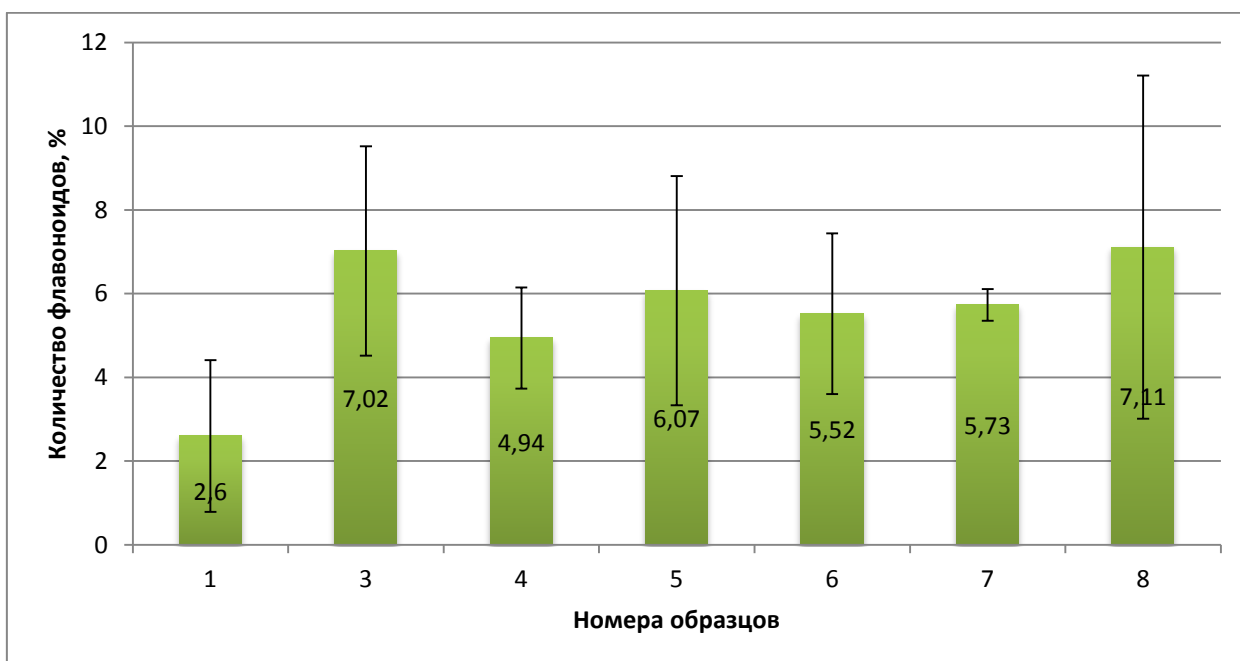
На диаграмме (рис. 3.3) представлены результаты определения содержания флавоноидов в образцах листьев мари белой, собранных в различных местообитаниях. Растения собирали в июле-августе (табл. 2), в фазу цветения-плодоношения. В этот период растения мари белой характеризуются самой большой массой листьев и высокой концентрацией биологически активных веществ. В ходе исследования установлено, что растения собранные в различных экологических условиях, отличаются уровнем содержания флавоноидов. Наибольшее количество общей суммы флавоноидов отмечено у растений образцов 3 и 8, произрастающих соответственно на площадке хранения технической соли и территории БОС. Меньшее количество флавоноидов отмечается в листьях растений образцов 5-7, также произрастающих в районе действующих промышленных предприятий. Наименьшее количество флавоноидов было отмечено в образце 1, произрастающем на садово-огородном участке, вдали от действующих предприятий и автодорог.

Образцы 1 и 4 содержали в листьях наименьшее количество флавоноидов по сравнению с другими образцами. Следует отметить, что экологические условия в этих местообитаниях характеризуются как относительно «чистые» (см. табл. 5).

Отдельного внимания заслуживает образец 3, произраставший на площадке хранения технической соли. Растения отличались мощным, сильно ветвистым, деревянистым стеблем с относительно крупными листьями. Выше было указано (гл. 2.1), что представители маревых часто обитают на засоленных почвах. Можно предположить, что повышенное содержание флавоноидов в данном случае является механизмом физиологической адаптации к этим условиям.

Растения, взятые с территории БОС (образец 8) были чахлые, мелкие, с маленькими листочками. Образцы имели неприятный запах, характерный данному месту. Тогда как содержание флавоноидов в них было самым

высоким. Возможно, это связано с влиянием эдафического фактора. Рядом исследователей выявлено как положительное, так и отрицательное воздействие повышенных количеств фосфора и калия на накопление флавоноидов; также установлено, что дефицит азота в почве стимулирует накопление фенольных соединений, в том числе и флавоноидов [33].



№	Точки сбора	Содержание флавоноидов, % на сухую массу (при p=0,95)
1	РТ, В.Услон, садово-огородный участок (условный контроль)	2,60 ± 1,81
3	РТ, В.-услонский район, площадка для хранения пескосоляной смеси (техническая соль)	7,02 ± 2,49
4	РТ, В.Услон, обочина дороги вдоль берега Волги	4,94 ± 1,21
5	РБ, пос. Бол.Куганак, территория между железной дорогой и насыпной автодорогой	6,07 ± 2,74
6	РБ, пос. Бол.Куганак, Стерлитамакский завод нефтеспецматериалов	5,52 ± 1,92
7	РБ, п.Бол.Куганак, Стерлитамакский кирпичный завод	5,73 ± 0,38
8	РБ, г. Стерлитамак, Стерлитамакские биологические очистные сооружения (БОС)	7,11 ± 4,10

Рисунок 3.3 Содержание флавоноидов, % на сухую массу

Содержание суммы флавоноидов в биомассе растений, произрастающих в зоне действия промышленных предприятий, превышает количество флавоноидов в биомассе растений условно-контрольного участка в 2-2,5 раза.

Повышение уровня содержания флавоноидов в надземной фитомассе растений может свидетельствовать также и о влиянии светового фактора. Образцы 3, 5, 8, произраставшие в более освещенных местообитаниях, характеризовались значительным содержанием флавоноидов. Накопление биологически активных веществ может быть связано с одной из их физиологических функций – защитой от ультрафиолетовой радиации.

Таким образом, показано, что содержание флавоноидов изменяется (возрастает), как под воздействием физических факторов, так и при наличии антропогенного прессинга (атмосферного промышленного загрязнения), что подтверждается и литературными данными [19]. Отмеченный факт свидетельствует об изменении хода метаболических процессов и фитохимического состава растений, вынужденных адаптироваться к загрязненной промышленными выбросами среде. Следовательно, данный признак может быть использован в качестве диагностического.

3.3 Влияние условий произрастания на содержание хлорофиллов

Широко распространенным показателем для индикации повреждения, вызванного действием загрязняющих воздух веществ, является снижение содержания хлорофилла. Физиология влияния вредных выбросов промышленных предприятий на пигменты растений широко обсуждается в литературе [4, 34, 48].

Исходя из полученных нами данных, показатель суммы пигментов (рис. 3.4) изменялся неоднозначно от 0,33 и 0,43 (№3 и 7) до 0,68-0,78 (№1, 5, 4, 6) (табл.6). Известно, что физиологическая адаптация может проявляться в изменении содержания хлорофиллов *a* и *b* по сравнению с контролем [53]. Однако в нашем исследовании, учитывая, что уровень антропогенной нагрузки был неодинаков в вариантах опыта, у

исследованных образцов не выявлено зависимости между суммой хлорофиллов и местом сбора растений.

Таблица №6. Зависимость значения суммы пигментов от места сбора растительных образцов

Точки сбора растительных образцов	Сумма пигментов, мг/г сух. массы
6. РБ, пос. Бол.Куганак, Стерлитамакский завод нефтеспецматериалов	0,784±0,23
4. РТ, В.Услон, обочина дороги вдоль берега Волги	0,731±0,11
5. РБ, пос. Бол.Куганак, территория между железной дорогой и насыпной автодорогой	0,727±0,13
1. РТ, В.Услон, садово-огородный участок	0,684±0,36
8. РБ, г. Стерлитамак, Стерлитамакские биологические очистные сооружения	0,509±0,13
7. РБ, п.Бол.Куганак, Стерлитамакский кирпичный завод	0,434±0,044
3. РТ, В.-услонский район, площадка для хранения пескосоляной смеси (техническая соль)	0,326±0,06

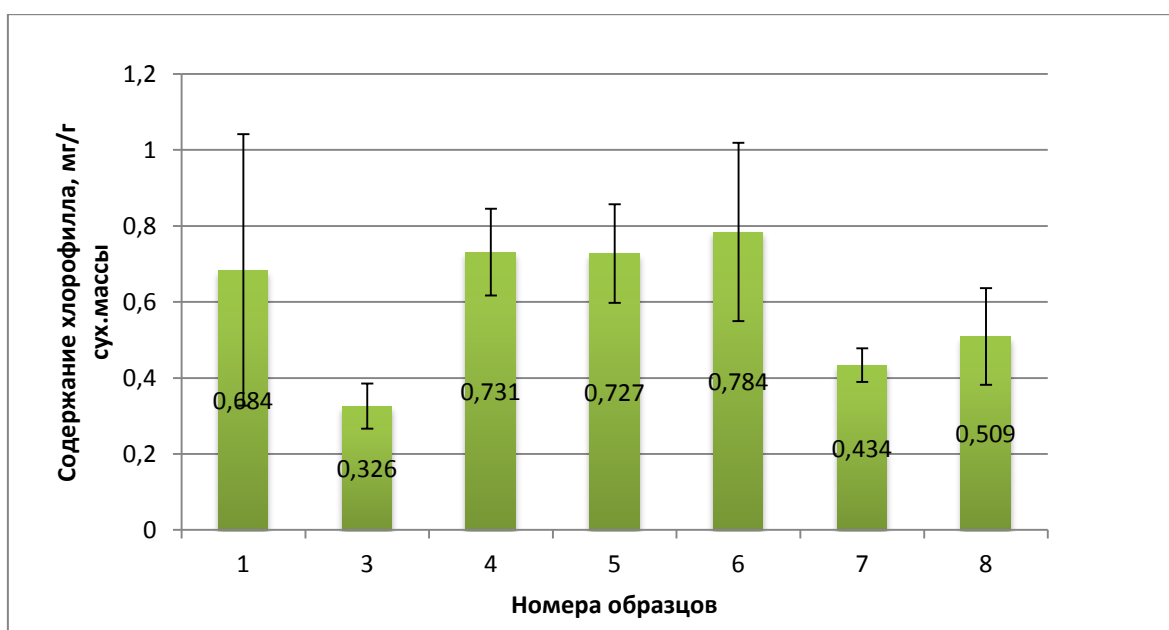


Рис. 3.4 Суммарное содержание пигментов, мг/г сух.массы

По литературным данным, помимо общего содержания хлорофилла, приспособленность растений к условиям определяется и качественным составом пигментов. Адаптация к высокой интенсивности светового потока достигается за счет значительного уменьшения относительной доли

хлорофилла *b*. Запыление растений в зоне промышленного, транспортного воздействия снижает на 5-14 % поглощение наиболее активных для фотосинтетической деятельности лучей спектра [41].

На диаграммах (рис. 3.5, 3.6) представлены результаты определения содержания хлорофиллов *a* и *b* в образцах листьев мари белой. Содержание хлорофилла *a* в исследованных образцах изменялось неоднозначно. В образцах 7, 8 и 3 оно было близко к условному контролю или незначительно снижалось. В образцах 4-6, напротив, возрастало в 1,5 раза относительно контрольного образца 1. Содержание хлорофилла *b* (рис. 3.6) во всех образцах (3-8) было ниже, чем в условном контроле. Известно, что хлорофилл *a* более эффективен в фотохимических реакциях, роль хлорофилла *b* ограничивается передачей захваченной энергии на хлорофилл *a*.

Точки отбора для образцов 4-6 характеризовались сходными условиями: нарушенностью почвенного покрова, высокой запыленностью и, как следствие, снижением уровня освещенности, что является неблагоприятным фактором для фотосинтетической активности [41]. Поэтому факт повышения содержания хлорофилла *a* в данных образцах можно рассматривать как приспособление растений к неблагоприятным условиям.

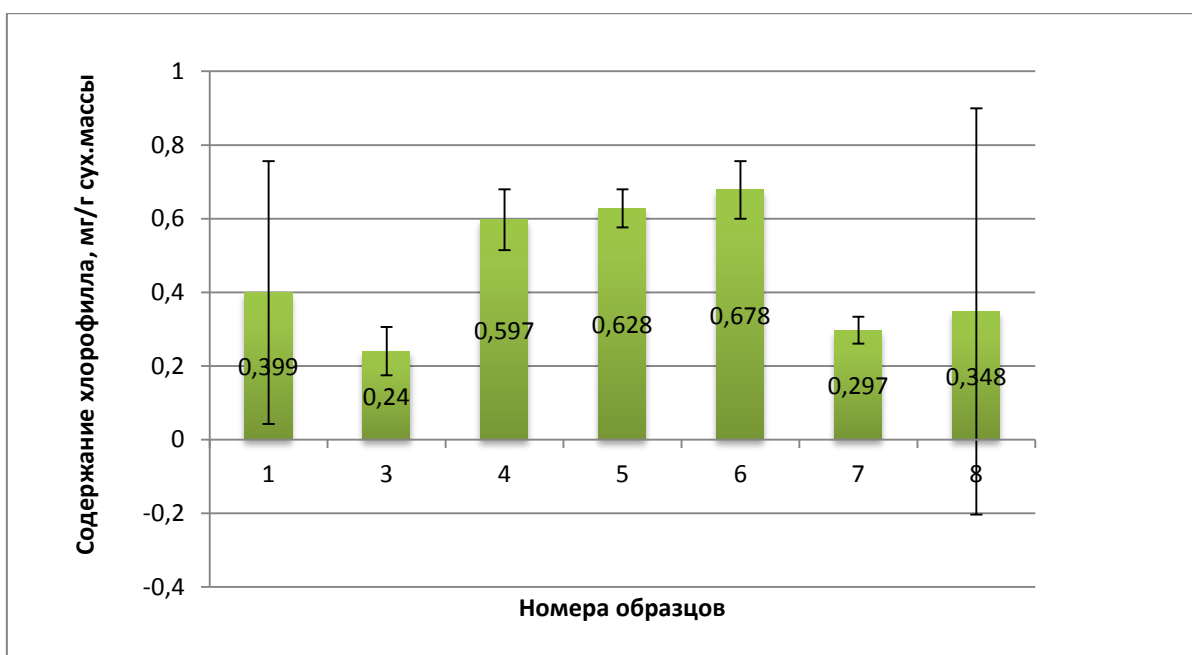


Рис. 3.5 Среднее значение содержания хлорофилла (*a*) в раст.мат., мг/г сух.массы

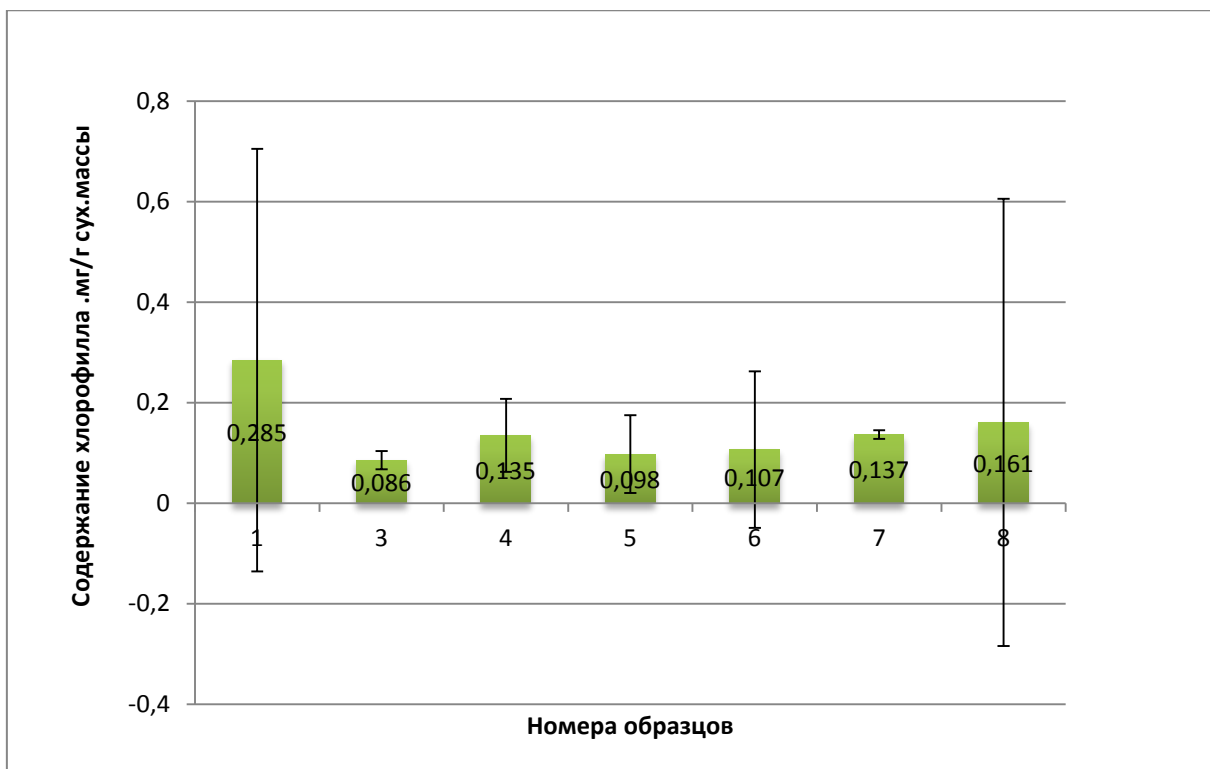


Рис. 3.6 Среднее значение содержания хлорофилла (*b*) в раст.мат., мг/г сухой массы

Экспериментально установлено, что хлорофилл *b* может выполнять защитную функцию: чем больше хлорофилла *b*, тем ниже чувствительность к яркому свету. Кроме всего прочего, при засухе в большей степени происходит разрушение хлорофилла *a*, чем *b* [41].

Показатель отношения хлорофилла *a/b* (рис.3.7; табл.7) может характеризовать потенциальную фотохимическую активность листьев. Высокая величина отношения *a/b* 6,37 и 6,36 (№5 и 6) относительно условного контроля 1,40 (№1) может служить признаком адаптации фотосинтетического аппарата к воздействию неблагоприятных факторов (высокая запыленность, выбросы предприятий, автотранспорта).

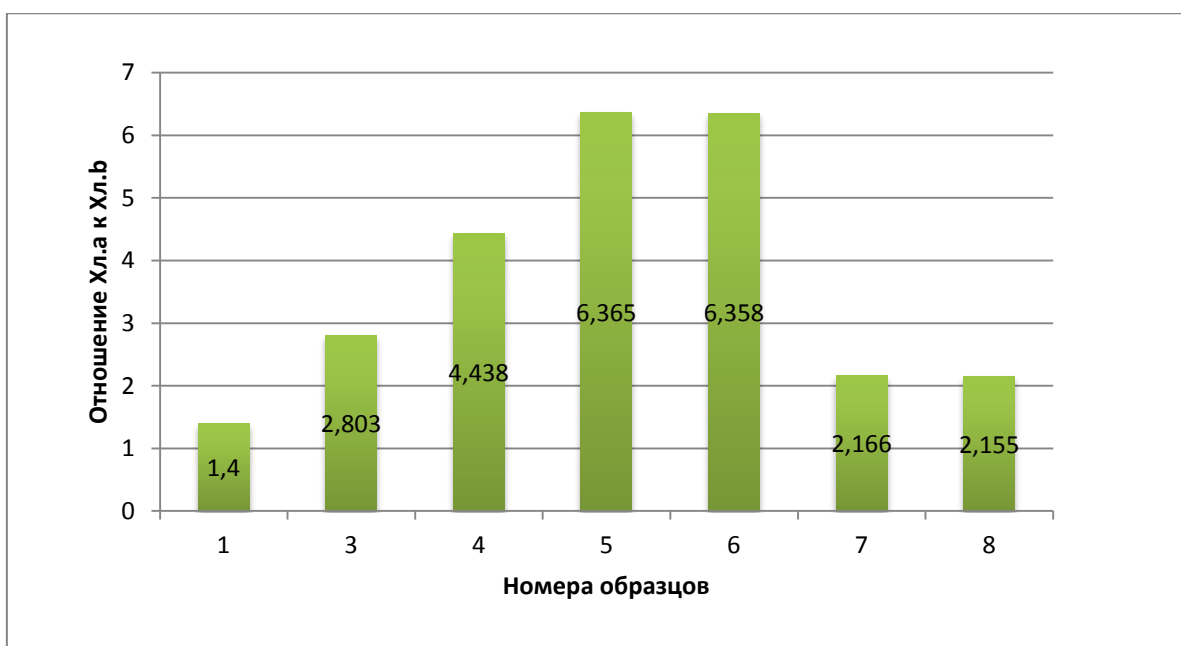


Рис. 3.7 Отношение содержания хлорофилла *a* к содержанию хлорофилла *b*

Таблица №7. Зависимость отношения хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* от места сбора растительных образцов

Точки сбора растительных образцов	Значение <i>a/b</i>
5. РБ, пос. Бол.Куганак, территория между железной дорогой и насыпной автодорогой	6,365
6. РБ, пос. Бол.Куганак, Стерлитамакский завод нефтеспецматериалов	6,358
4. РТ, В.Услон, обочина дороги вдоль берега Волги	4,438
3. РТ, В.-услонский район, площадка для хранения пескосоляной смеси (технической соли)	2,803
7. РБ, п.Бол.Куганак, Стерлитамакский кирпичный завод	2,166
8. РБ, г. Стерлитамак, Стерлитамакские биологические очистные сооружения	2,155
1. РТ, В.Услон, садово-огородный участок (условный контроль)	1,400

Таким образом, показана важная роль фотосинтетических пигментов в адаптации растений в экосистемах, где они подвергаются воздействию неблагоприятных почвенно-климатических условий и антропогенному прессингу [36].

3.4 Изменение содержания флавоноидов и хлорофиллов в листьях мари белой как показатель состояния окружающей среды

На роль освещённости в интенсивности и уровне накопления флавоноидов указывает ряд литературных данных [15, 37]. Так по результатам эксперимента с искусственным затенением растений цмина песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench), поставленного Н.В. Машурчак в 2009 г в опыте и в контроле общая динамика накопления флавоноидов была сходной, но в каждый отдельный период развития процентное содержание флавоноидов в «затененных» растениях было более чем в два раза ниже, чем в растениях контрольной группы [35].

Анализируя ход изменения флавоноидов и пигментов в зависимости от условий произрастания, нами была отмечена обратная линейная зависимость этих показателей. Были рассчитаны коэффициенты корреляции содержания флавоноидов в листьях мари белой с суммой пигментов ($r = -0,5249$), содержанием хлорофилла *a* ($r = -0,21868$), содержанием хлорофилла *b* ($r = -0,79909$). Полученный в последнем случае высокий коэффициент корреляции указывает на возможность прямой зависимости повышения содержания флавоноидов при разрушении хлорофилла *b*. Из литературы известно, что хлорофилл *b* может выполнять защитную функцию, понижая чувствительность к яркому свету [41]. Возможно, в нашем случае эту функцию выполняют флавоноиды.

Таким образом, содержание биологически активных веществ в растениях зависит от физико-химических характеристик среды обитания – экологических факторов. Исследование состояния пигментной системы растений и флавоноидов может быть полезно для оперативной биоиндикации загрязнений при экологическом мониторинге растительных сообществ, подвергающихся воздействию неблагоприятных факторов среды.

Выводы

1. В листьях мари белой исследованных образцов содержится значительное количество (до 7%) флавоноидов. Содержание этих веществ связано с местом сбора растений. Сорничающий вид *Chenopodium album*, образующий огромные сырьевые массивы, представляет интерес как источник флавоноидов (с учетом экологической безопасности).
2. Количество флавоноидов в биомассе растений всех опытных образцов повышается в 2-3 раза относительно контроля. Отмеченный факт свидетельствует об изменении хода метаболических процессов под воздействием физико-химических характеристик среды обитания.
3. Содержание пигментов изменялось неоднозначно: в опытных образцах содержание хлорофилла *a* повышалось, хлорофилла *b* - снижалось относительно контроля. Показатель отношения хлорофилла *a/b* в вариантах опыта был выше условного контроля, что характеризует высокую потенциальную фотохимическую активность листьев опытных образцов.
4. Установлена высокая степень обратной корреляции между показателями содержания флавоноидов и хлорофилла *b* в листьях мари белой. Изменение состояния пигментной системы растений и флавоноидов может быть использовано при экологическом мониторинге растительных сообществ, подвергающихся воздействию неблагоприятных факторов среды.

Литература

1. Александров Ю.И., Беляков В.И. Погрешность и неопределенность результата химического анализа // Журнал аналитической химии. - 2002. - Т. 57. - №2. - С. 118–129.
2. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. Физиология растений Под ред. И. П. Ермакова Издательство: Москва. "Academia". Год: 2005. Страниц: 640.
3. Андрианова Ю.Е., Тарчевский И.А. Хлорофилл и продуктивность растений – М.: Наука, 2000. – 135 с.
4. Баженов А.В., Шавнин С.А. Оценка степени поражения фотосинтеза сосны обыкновенной аэротехногенными выбросами // Экология. - 1994. - № 4. - С. 89-91.
5. Беликов В.В. Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация. 1970. - №1. - С. 68.
6. Беликов В.В. Оценка содержания флаванол-производных в плодах *Silybum marianum* (L.) Gaertn. // Растительные ресурсы. 1985. - Т. 21. - Вып. 3. - С. 350-358.
7. Беликов В.В., Колесник Н.Т. А. с. СССР № 1507394. Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье / 1989.
8. Валиева А.И., Абдрахимова Й.Р. Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты (Часть 3. Фенольные соединения): Учебно-методическое пособие. – Казань: Казанский Федеральный университет, 2010. - 40 с.
9. Васильева К.А., Зайцев Г.А., Кулагин А.Ю. Состояние пигментного комплекса ассимиляционного аппарата клена остролистного (*Acer platanoides* L.) в условиях загрязнения. Вестник Московского государственного университета леса - Лесной вестник. 2011. - № 3. - С. 51-54.

10. Воронина О.Е., Ефимцев Е.И., Татарина Т.А. Пигментный аппарат растений в условиях антропогенного воздействия Вестник Московского государственного университета леса - Лесной вестник. 1999. - № 2. - С. 82.
11. Высочина Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных. Новосибирск, 2004. 240 с.
12. Высочина Г.И., Шалдаева Т.М., Коцупий О.В., Храмова Е.П. Флавоноиды мари белой (*Chenopodium album* L.), произрастающей в Сибири// Химия растительного сырья. - 2009. - №4. - С. 107–112.
13. Георгиевский В.П., Рыбаченко А.И. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений// Северо-Кавказский научный центр высш. шк. – Ростов-на-Дону: Издательство Ростовского университета, 1988. – 143 с.
14. Гетко Н.В. Растения в техногенной среде. Минск: Наука и техника, 1989. 208 с.
15. Горюнова Ю.Д. Влияние экологических факторов на содержание в растениях некоторых антиоксидантов. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Калининград, 2009. - 24 с.
16. ГОСТ 24027.0-80. Правила приемки и методы отбора проб. – Введ. 1981 – 01 – 01. - М.: Изд-во стандартов. – 5 с.
17. ГОСТ 24027.2-80. Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных веществ, эфирного масла. – Введ. 1981 – 01 – 01. – М.: Изд-во стандартов. – 10 с.
18. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. М., 1990. , Вып. 2. 398 с.
19. Гусев Н.Ф., Немерешина О.Н. Влияние техногенного загрязнения на содержание флавоноидов в растениях семейства норичниковых Степного Предуралья // Вестник ОГУ. – 2004. - №10. - С.123-126.
20. Гусев Н.Ф., Немерешина О.Н. К исследованию флавоноидов *Veronica incana* Степного Предуралья // Вестник ОГУ. – 2005. - №12. - С.96-99.
21. Жапова О.И. Эколого-фитоценологическая приуроченность *Nemerocallis minor* Miller и накопление в нем биологически активных веществ

- (Забайкалье) Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук; ред. Т.Н. Чудинова. Издательство ВСГТУ. 2006 г.
22. Жапова О.И., Анцупова Т.П. Накопление флавоноидов и микроэлементов в *Нemerocallis minor* Miller // Химия и технология растительных веществ: IV всероссийская научная конференция. – Сыктывкар, 2006. – С. 70.
23. Жапова О.И., Анцупова Т.П., Кулырова А.В. К проблеме исследования флавоноидосодержащих растений на территории Восточного Забайкалья // Материалы научно-практической конференции посвященной 70-летию БГСХА. – Улан-Удэ, 2001. – С113-116.
24. Иванов В.Б., Плотникова И.В., Живухина Е.А. и др. Практикум по физиологии растений: учебное пособие для студ. высших пед. учеб. заведений; под ред. В.Б. Иванова. – 2-е изд., испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 144 с.
25. Карпова Е.А., Храмова Е.П., Высочина Г.И. Содержание флавоноидов в некоторых видах рода *Euphorbia* L. // Химия растительного сырья. — 2008. - №3. - С. 75-81.
26. Каухова, И. Е. Особенности экстрагирования биологически активных веществ двухфазной системой экстрагентов при комплексной переработке лекарственного растительного сырья // Растительные ресурсы. – 2006. – Т. 42. – Вып. 1. – С. 82-91.
27. Киселева Т.Ф. "Технология сушки: Учебно-методический комплекс", – /Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2007. – 117 с.
28. Клышев Л. К., Бандюкова В. А., Алюкина Л. С. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования); отв. ред. М. И. Горяев; Институт ботаники АН КазССР. - Алма-Ата: Наука, 1978. - 220 с.
29. Коротченко И.С. Влияние тяжелых металлов на содержание фотосинтетических пигментов в листьях моркови // Вестник

- Красноярского государственного аграрного университета. - 2011. - № 4. - С. 86-91.
- 30.Кривошеева А.А., Шавнин С.А., Калинин В.А., Венедиктов П.С. Влияние промышленных загрязнений на сезонные изменения содержания хлорофилла в хвое сосны обыкновенной // Физиол. раст. - 1991. - Т. 38. - Вып. 1. - С. 163-168.
- 31.Латыпова Г.М., Романова З.Р., Бубенчикова В.Н., Аюпова Г.В. Исследование качественного и количественного состава флавоноидных соединений густого экстракта первоцвета лекарственного // Химия растительного сырья. - 2009. - №4. - С. 113–116.
- 32.Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. - 2004. - №1. - С. 47–52.
- 33.Ломбоева С.С., Танхаева Л.М., Оленников Д.Н. Динамика накопления флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) // Химия растительного сырья. - 2008. - №3. - С. 83–88.
- 34.Мальхотра С.С., Хан А.А. Биохимическое и физиологическое действие приоритетных загрязняющих веществ//Загрязнение воздуха и жизнь растений/Под ред. Трешоу М.Л. М.: Гидрометиздат, 1988. С. 144-189.
- 35.Машурчак Н.В. Влияние условий произрастания на накопление флавоноидов в природных и экспериментальных популяциях цмина песчаного (*Helichrysum avenarium* (L.) Moench) в Саратовской области// Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Саратов, 2010.
- 36.Межунц Б.Х., Навасардян М.А. Количественная характеристика фотосинтетических пигментов травяных растений горных экосистем Армении, Вестник тюменского государственного университета. 12-2002. С.220-226
- 37.Минаева В.Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование - Новосибирск: Наука, 1978. - 254 с.

38. Немерешина О. Н. Биоэкологические особенности растительного покрова степного Предуралья в зоне влияния выбросов газоперерабатывающего предприятия Автореф. дис. На соискание уч. степени кан. биол. наук. Оренбург, 2001.
39. Николаева М. К., Маевская С. Н., Шугаев А. Г., Бухов Н. Г. Влияние засухи на содержание хлорофилла и активность ферментов антиоксидантной системы в листьях трех сортов пшеницы, различающихся по продуктивности // Физиология растений – 2010. - № 1. – С. 94-102.
40. Огай М.А., Степанова Э.Ф., Ларионов Л.П., Петров А.Ю. Идентификация и количественная оценка флавоноидов в комплексных фитопрепаратах. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Год выпуска: 2010 Том: 10.
41. Павлов И.Н. Древесные растения в условиях техногенного загрязнения – Улан-Удэ: БНЦ СО РАН, 2005. – 360 с.
42. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Раеoniaceae-Thymelaeaceae / Отв. ред. П.Д. Соколов. Л., 1986. С. 336.
43. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; семейства Magnoliaceae – Limoniaceae. Л., 1985. 460 с.
44. Рогова Т.В., Прохоров В.Е., Фардеева М.Б., Шайхутдинова Г.А. Атлас сосудистых растений Татарстана – Казань: Изд-во «Идель-Пресс», 2008. – 304 с.
45. Титова М.С. Содержание фотосинтетических пигментов в хвое *Picea abies* и *Picea koraiensis* Вестник Оренбургского государственного университета. - 2010. - № 12. - С. 9-12.
46. Трешоу М. Загрязнение воздуха и жизнь растений / Л.: Гидрометеиздат, 1988.
47. Тужилкина В.В. Реакция пигментной системы хвойных на длительное аэротехногенное загрязнение // Экология. – 2009. - №4. – С. 243-248.

48. Тужилкина В.В., Ладанова Н.В., Плюснина С.Н. Влияние техногенного загрязнения на фотосинтетический аппарат сосны // Экология. - 1998. - № 2. - С. 89-93.
49. Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки // Вопросы питания. – 1996. - № 2. - С.33-38.
50. Халил Д. А., Коломиец И. И. Концентрация и активность хлорофилла как индикаторы биофизического мониторинга окружающей среды. Национальный институт экологии Республики Молдова. - 2012.
51. Харборн Дж. Введение в экологическую биохимию. М., 1985. 312 с.
52. Храмова Е.П., Высочина Г.И., Тарасов О.В., Куценогий К.П., Крылова Е.И., Трубина Л.К., Сыева С.Я. Биохимические механизмы адаптации растений в условиях радиационного воздействия // Химия в интересах устойчивого развития – 2008. - №16. - С. 1-9.
53. Черкашина М.В., Петухова Г.А. Влияние техногенной нагрузки на изменение содержания пигментов фотосинтеза и степени окраски древесных и травянистых растений // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – № 5 – С. 81-82.
54. Чирикова Н.К., Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Определение количественного содержания флавоноидов в надземной части шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis georgi*) // Химия растительного сырья. - 2009. - №4. - С. 99–105.
55. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154-170.
56. Bhargava A., Shukla S., Ohri D. Medicinal uses of *Chenopodium* - a review // Journ. Med. and Arom. Plant Sci. 2005.V. 27. №2. P. 309-319.
57. Cook N.C., Samman S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources // J. Nutrit. Biochem. 1996. V. 7. №2. P. 66-76.

58. Gadano A., Gurni A., Carballo M.A. Herbal medicines: Cytotoxic effects of Chenopodiaceae species used in Argentinian folk medicine // *Pharmaceutical biology*. 2007. V. 45. №3. P. 217-222.
59. Geissman T.A. The chemistry of Flavonoid compounds. Pergamon Press., New.Jork., 107. Oxford-London, 1982.
60. Harborne J.B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992 // *Phytochemistry*.-2000. - Vol. 55. - P. 481-504.
61. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency // *Biochem. Pharmacol.* 1983. V. 32. № 7. P. 1141–8.
62. Ibrahim L.F., Kawashty S.A., Baiuomy A.R., Shabana M.M., El-Eraky W.I., El-Negoumy S.I. A comparative study of the flavonoids and some biological activities of two *Chenopodium* species // *Chem. Nat. Comp.* 2007. V. 43. №1. P. 24-28.
63. Rahiminejad M.R., Gornall R.J. Flavonoid evidence for allopolyploidy in the *Chenopodium album* aggregate (Amaranthaceae) // *Plant Syst. Evol.* 2004. V. 246. №1–2. P. 77–78.
64. Rice-Evans C.A., Miller N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food // *Biochem. Soc. Trans.* 1996. V. 24. №3. P. 790-795.
65. Биотехнология для медицины // Научно-популярный портал Фонд Вечная молодость. 2010. URL: <http://www.vechnayamolodost.ru/> (дата обращения 14.03.2013)
66. Верхнеуслонский район // Татцентр.ру, деловой центр республики Татарстан. 2013. URL: <http://www.tatcenter.ru/region/29/> (дата обращения 16.03.2013)
67. Игуменова О.П. Экологический мониторинг юго-западной территории Республики Башкортостан // Мониторинг и биоразнообразие экосистем Сибири и Дальнего Востока: сборник научных статей. – 2012. – 140 с. URL: http://geobotany.narod.ru/nach_05.htm/ (дата обращения 18.03.2013)

68. Марь белая (лебеда белая): описание растения. // Herbal Food. 2012. URL: <http://herbalfood.ru/mar-lebeda/mar-belaya-lebeda-belaya/> (дата обращения 10.04.2013)
69. Марь белая // Википедия. 2013. URL: http://ru.wikipedia.org/wiki/Марь_белая/ (дата обращения 10.04.2013)
70. Мустафин Р.А. Татарстан: время экологического туризма // Время и деньги, 2005. URL: <http://www.e-vid.ru/index-m-192-p-63-article-9379.htm/> (дата обращения 25.03.2013)
71. Растения в условиях химического загрязнения окружающей среды // Лес и экология. 2012. URL: <http://les-pitomnik.ru/vliyanie-zagryaznenij-na-rasteniya/> (дата обращения 29.03.2013)
72. Стерлитамакский район // Википедия. 2012. URL: http://ru.wikipedia.org/wiki/Стерлитамакский_район/ (дата обращения 16.03.2013)
73. Флавоноиды, общая характеристика / Частная фармакогнозия // Зеленая аптека, 2013. URL: <http://www.fito.nnov.ru/special/glycozides/flavo/> (дата обращения 27.03.2013)
74. Хранение, упаковка и маркировка лекарственного растительного сырья / Общая фармакогнозия // Зеленая аптека, 2013. URL: http://www.fito.nnov.ru/common/common_04.phtml/ (дата обращения 27.03.2013)