

УДК 581.1:632.122.1

Изменчивость изопероксидаз растений в местах прошлого уничтожения химического оружия

© 2008. А.П. Стаценко, А.И. Иванов, А.А. Вьюговский
 Пензенский государственный университет,
 Региональный центр государственного экологического контроля
 и мониторинга по Пензенской области,
 e-mail: rcgekim@mail.ru

В статье рассматривается трансформация фермента пероксидазы в вегетативных органах высших растений в условиях химического загрязнения природных сред продуктами деструкции боевых отравляющих веществ.

The article deals with peroxidase ferment transformation in vegetative parts of highest plants in conditions of natural environments chemical contamination with combat toxic agents destruction products.

Ключевые слова: растительные ферменты, пероксидаза, химическое загрязнение

В субъектах Российской Федерации, на территории которых производилось и хранилось химическое оружие в 1950 – 1960-е годы прошлого столетия, осуществлялись мероприятия по его захоронению и уничтожению. В результате этого природные среды в этих районах оказались сильно загрязнёнными продуктами деструкции боевых отравляющих веществ, а места их захоронения потенциально опасны для населения этих регионов. В связи с этим возникла проблема детального обследования и экологической реабилитации мест прошлого уничтожения химического оружия [1, 2].

В настоящее время при обследовании загрязнённых природных сред широко используются физические и химические методы, которые ограничиваются количественными характеристиками действия поллютантов на природные объекты и не определяют его качества [3]. Многочисленные исследования показывают, что наиболее перспективной для оценки химического загрязнения экосистем является биоиндикация на уровне биохимических и физиологических реакций [3, 4, 5]. Преимущество этого метода заключается в высокочувствительности и оперативности оценки, позволяющем выявить сверхмалые концентрации загрязняющих веществ в кратчайшие сроки, а также оценить качество их действия на живые объекты. Этот уровень открывает перспективы ранней диагностики дисбаланса в экосистемах [4]. Часто в качестве физиологических и биохимических индикаторов используется изменчивость концентрации и активности макромолекул: белков, липидов, полисахаридов и др. [6].

Известно, что даже низкое содержание продуктов деструкции отравляющих веществ

вызывает в растительном организме существенные трансформации обмена веществ [3, 5]. В частности, метилфосфоновая кислота, являющаяся конечным продуктом гидролиза фосфорсодержащих отравляющих веществ, в малых концентрациях (0,01-0,05 моль/л) вызывает в растениях окислительный стресс и влияет на важнейшие процессы жизнедеятельности (рост, накопление биомассы, дыхание, содержание пигментов) и пр. [7].

В научной литературе накоплены многочисленные сведения о том, что наиболее активную ответную реакцию на химический стресс проявляют ферментные системы, в том числе растительные пероксидазы, степень трансформации которых служит объективным показателем уровня загрязнения природных сред [5, 8, 9]. В связи с этим нами изучалась возможность использования количественной и качественной изменчивости фермента пероксидазы вегетативных органов высших растений для комплексной оценки качества загрязнения территории мест прошлого уничтожения и захоронения химического оружия на территории Пензенской области, где природные среды загрязнены мышьяком, диоксинами, тяжёлыми металлами и другими опасными химическими соединениями, являющимися продуктами деструкции боевых отравляющих веществ.

Объекты и методика исследования

В качестве объектов исследования использовали вегетативные органы (хвою и листья) растений различных систематических групп: сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*),

дуб черешчатый (*Quercus robur*), крапивва двудомная (*Urtica dioica*).

Растительные образцы отбирали в незагрязнённой (контрольной) зоне (Золотарёвский сосновый бор), а опытные – в местах прошлого уничтожения химического оружия с различным уровнем загрязнения (окрестности пос. Леонидовка). Фермент пероксидазу из растительной ткани выделяли с использованием стандартной методики. Для этого навеску растительной ткани (2 г) измельчали с помощью скальпеля, затем заливали семикратным объёмом 0,005М трисглицинового буфера, содержащего 30% сахаразы и растирали в фарфоровой ступке на холоде до получения однородной массы. Гомогенат в течение часа выдерживали при температуре 4°C и центрифугировали при скорости 8 тыс. об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость использовали в качестве источника пероксидазы.

Катодный электрофорез пероксидазы проводили по методике Дэвиса [10] в цилиндрических гелях размером 0,6x7,0 см в 7,5%-ном полиакриламидном геле с использованием трисглициновой буферной системы рН=8,3 с охлаждением. Время проведения электрофореза 2 час. 20 мин. Первые 20 мин. сила тока на гелевую трубку не превышала 2 мА, а затем её увеличивали до 4 мА.

После окончания электрофореза гели опускали на 30 мин. в 0,02%-ный раствор солянокислого бензидина, а затем – в 0,01%-ный раствор пероксида водорода до появления голубых полос изоферментов. Затем реакционную смесь сливали, а гели промывали 10%-ным раствором уксусной кислоты.

В качестве стандарта использовали промышленный препарат пероксидазы хрена.

Количественную изменчивость изоферментов пероксидазы оценивали по скорости их проявления по методике Лиу [11].

Результаты и их обсуждение

Качественная изменчивость растительных пероксидаз является объективным показателем степени химического загрязнения природных сред [5, 8, 9, 12].

Анализ электрофоретических спектров изоферментов исследуемых растений показывает, что в зоне загрязнения среды продуктами деградации отравляющих веществ фермент отличается повышенной гетерогенностью.

В частности, низкий уровень загрязнения обусловил незначительные изменения в изо-

зимном спектре. Причём наиболее существенные новообразования отмечаются в группе «медленных» изоферментов А-зоны с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) от 0 до 30, где зафиксировано появление по одному новому компоненту у сосны обыкновенной (А24) и дуба черешчатого (А7) и двух компонентов (А4 и А21) у крапивы двудомной. В то же время в зонах среднеподвижных (В-зона) и «быстрых» компонентов (С-зона) качественных изменений не зафиксировано.

Высокий уровень загрязнения поллютантами повлёк за собой более глубокую трансформацию изоферментов спектра. Значительные перестройки изоферментов были зафиксированы как в зоне «медленных» изоферментов, так и в среднеподвижной В-зоне с ОЭП от 31 до 60, где у сосны обыкновенной вновь появились три изофермента (А3, А4, В47), у дуба черешчатого – два (А3 и В34), у крапивы двудомной – четыре (А7, А26, В34, В57) компонента. Кроме того, сильное химическое загрязнение стало причиной качественного изменения изоферментов в зоне «быстрых» компонентов (С-зона) с ОЭП от 61 до 100 в листьях дуба черешчатого, где зафиксирована одна новая фракция С68.

Аналогичные новообразования в изоферментных спектрах пероксидазы пшеницы, барбариса, бересклета в условиях химического стресса описаны другими исследователями [3, 12].

Известно, что сверхмалые (следовые) концентрации химических загрязнителей

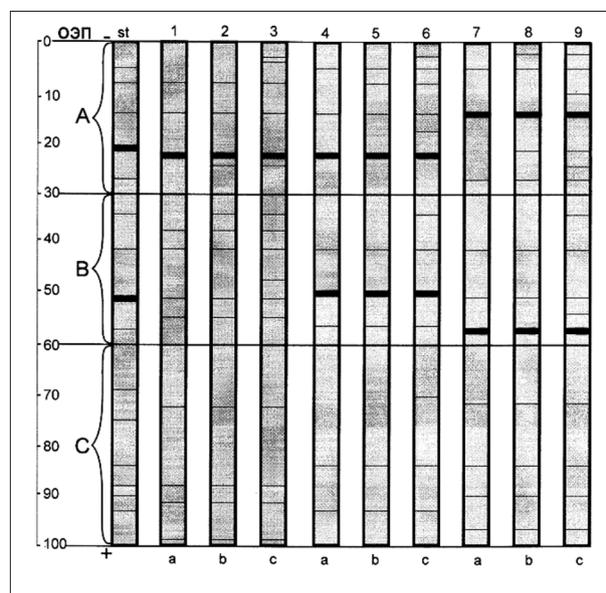


Рисунок. Электрофореграммы изоферментов пероксидазы растений в условиях химического загрязнения (1-3 – сосна обыкновенная; 4-6 – дуб черешчатый; 7-9 – крапива двудомная; а – контроль, б – низкий уровень загрязнения; с – высокий уровень загрязнения)

Таблица

Влияние сверхмалых концентраций поллютантов на количественную изменчивость пероксидазы листьев крапивы двудомной

ОЭП изозима	Незагрязненная зона (контроль)		Зона сверхмалого загрязнения	
	Активность изозима, %	Суммарная активность группы, %	Активность изозима, %	Суммарная активность группы, %
4	14,3	А-зона 67,3·1,2	15,5	А-зона 71,8·1,5
15	36,9		38,8	
28	16,1		17,5	
41	3,1	В-зона 13,1·0,7	2,8	В-зона 13,6·0,8
52	2,6		3,0	
58	7,4		7,8	
74	5,5	С-зона 19,6·1,0	4,6	С-зона 14,6·1,8
83	4,3		3,5	
91	5,1		3,4	
97	4,7		3,1	

в природных средах практически невозможно зафиксировать и оценить качество их воздействия на живые объекты с помощью физико-химических аналитических методов [4, 6].

В этом случае наиболее перспективным является использование для оценки качества природной среды методов биохимической индикации с использованием количественной изменчивости растительных ферментов, в частности, пероксидазы [6].

Нами исследовалась возможность использования количественной изменчивости изоферментов пероксидазы листьев крапивы двудомной для качественной оценки состояния природной среды под влиянием сверхмалого (следового) химического загрязнения продуктами деструкции боевых отравляющих веществ (рис.).

Для удобства анализа катодные изоферменты по относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) условно разделили на три зоны: А-зона (ОЭП от 0 до 30), В-зона (от 31 до 60), С-зона (от 61 до 100).

Исследования показали, что сверхмалые концентрации поллютантов не вызывают качественных изменений в изозимном спектре листьев крапивы двудомной, в результате чего гетерогенность спектров катодных изоферментов остаётся неизменной (табл.).

В то же время на слабозагрязнённых территориях отмечаются существенные количественные перестройки в спектральном составе. Оценка сопряжённости наличия химического загрязнения с активностью отдельных изозимов пероксидазы позволила нам выделить три группы изозимов. В первую группу вошли изоферменты, положительно реагирующие на химическое загряз-

нение, во вторую – отрицательно коррелирующие с этим фактором, а в третью – «инертные», активность которых не связана с загрязнением среды.

К первой группе отнесены все изоферменты А-зоны, ко второй – изозимы С-зоны. В то же время В-зона характеризовалась наличием в ней изоформ, обнаруживающих как прямую, так и обратную зависимость по отношению к химическому загрязнению. Следует также отметить, что во всех трёх зонах катодной части спектра зафиксированы изозимы, которые в условиях загрязнения среды практически не меняют своей активности.

На наш взгляд, изозимы А-зоны являются ответственными за адаптивные, а возможно, защитные реакции растительных тканей в условиях химического стресса.

Следовательно, количественная и качественная изменчивость катодных изоферментов является объективным тестовым признаком химического загрязнения и может быть использована для оценки качества экосистем в местах прошлого уничтожения и захоронения химического оружия.

Литература

1. Иванов А.И., Панкратов В.М. Обследование и экологическая реабилитация мест прежнего уничтожения химического оружия на территории Пензенской области. Пенза: Российский Зелёный Крест, 2006. 75 с.
2. Иванов А.И., Панкратов В.М. Экологические проблемы наследия холодной войны и пути их преодоления. Пенза: Российский Зелёный Крест, 2004. 89 с.
3. Кривошук Д.А.. Биоиндикация и биомониторинг. М.: Наука, 1991. 285 с.
4. Смирнова Н.Н. Биологические методы оценки природной среды. М.: Наука, 1978. 278 с.

5. Стаценко А.П., Иванов А.И., Конкина Е.Е. Биохимическое тестирование загрязнения окружающей среды // Современные проблемы экологии. Москва – Тула: Тульский госуниверситет, 2007. С. 65-67.

6. Афанасьев Ю.А.. Мониторинг и методы контроля окружающей среды. М.: МНЭПУ, 2001. 292 с.

7. Огородникова С.Ю., Головкин, Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакция растений на действие метилфосфоновой кислоты // Теоретическая и прикладная экология. 2007. №1. С. 78-83.

8. Сарсенбаев К.Н., Мезенцева Н.И., Полимбетова Ф.А. Влияние двуокиси серы на активность и компонентный состав свободной и связанной фракций пе-

роксидазы проростков яровой пшеницы // Физиол. и биох. культ. растений. 1983. Т. 15. № 1. С. 51-55.

9. Савич И.М. Пероксидазы - стрессовые белки растений // Успехи современной биологии. 1989. Т. 107. № 3. С. 406-417.

10. Davis B.J. Disc electrophoresis. Method and application to human series proteins // Ann. New York Acad. Sci. 1964. V. 121. № 4. P. 404-427.

11. Liu E.H. Simple method for determining the relative activities of individual peroxidase isozymes in a tissue extract // Anal. Biochem. 1973. № 1. P. 149-154.

12. Сарсенбаев К.Н., Полимбетова Ф.А. Роль ферментов в устойчивости растений. Алма-Ата: Наука, 1986. 184 с.

УДК 631.46:631.45

Липа мелколистная *Tilia cordata* L. как перспективный биоиндикатор мышьяковистого загрязнения почвы

© 2008. Н.В. Козловская, И.М. Янников, Е.С. Шичаева, М.С. Емельянова, Е.В. Щенина
Удмуртский государственный университет, e-mail: natvk@udm.ru

В серии вегетационных опытов показано, что при оценке мышьяковистого загрязнения почвы можно использовать черенки липы мелколистной. Оценку степени загрязнения проводят по доле сухих почек, листьев и покраснению коры деревьев.

A series of vegetation experiments shows that in estimating arsenous soil contamination it is possible to use grafts of *Tilia cordata* L. The estimation of contamination degree is made according to the amount of dry buds and leaves and branches bark reddening.

Ключевые слова: биоиндикаторы, мышьяк, загрязнение почвы

В связи с тем, что на территории Удмуртской Республики расположен объект по хранению и уничтожению химического оружия (ОХУХО), в том числе мышьякорганических соединений (люизит), проблема биоиндикации мышьяковистого загрязнения окружающей среды является весьма актуальной. Основные воздействия на компоненты природных экосистем в зоне защитных мероприятий (ЗЗМ) объектов, согласно прогнозам, будут связаны с поступлением в окружающую природную среду мышьяксодержащих химических соединений на стадии эксплуатации объекта в штатном режиме, а также в случае аварийных ситуаций.

Мышьяк превосходит по токсичности большинство химических элементов. Наиболее биологически активны подвижные формы мышьяка, при этом As^{3+} (арсениты) более токсичны для животных, чем As^{5+} (арсенаты), и образуются путем восстановления последних в анаэробных условиях переувлажненных почв болот и донных отложений.

Целью нашего эксперимента была оценка реакции липы мелколистной *Tilia cordata* L. на разные концентрации мышьяксодержащего раствора.

Для закладки лабораторных исследований выбрана общепринятая методика проведения вегетационных опытов.

Мышьяксодержащие органические соединения в почве трансформируются до неорганических арсенатов и арсенитов. Для моделирования загрязнения был использован водный раствор арсенита кальция $Ca_3(AsO_3)_2$ различной концентрации. В качестве ключевого значения концентрации загрязнителя использована фоновая величина для почв Удмуртской Республики.

Вегетационный эксперимент проводился в 4 вариантах концентрации раствора – 2,8 мг/л, 28 мг/л, 56 мг/л, 112 мг/л (соответственно: фон, 10-кратное, 20-кратное и 40-кратное превышение фона) в лабораторных фарфоровых стаканах ёмкостью 250 мл, в четырёхкратной повторности.