

Оценка токсических эффектов метилфосфоновой кислоты по ответным биохимическим реакциям фототрофных организмов

© 2013. Е. В. Коваль¹, аспирант, Л. С. Свинолупова¹, аспирант,
С. Ю. Огородникова^{1,2}, к.б.н., доцент, с.н.с.,

¹Вятский государственный гуманитарный университет,

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
e-mail: svetao_05@mail.ru

Изучены ответные биохимические реакции природных биоплёнок с доминированием *Nostoc commune* и семян ячменя при прорастании на действие метилфосфоновой кислоты (МФК). Установлено, что МФК инициирует окислительные процессы в клетках цианобактерий, что проявляется в накоплении продуктов перекисного окисления липидов и снижении содержания хлорофилла *a*. Проращивание семян в присутствии МФК приводит к снижению активности пероксидаз в семенах, жизнеспособности и всхожести семян ячменя. Изученные биохимические показатели могут быть использованы для разработки методов биодиагностики природных сред, загрязнённых МФК.

Response biochemical reactions of natural biofilms with dominating of *Nostoc commune* and barley seeds during germination to methylphosphonic acid (MPA) are studied. It is found out that MPA initiates oxidative processes in cyanobacteria cells, which results in accumulation of lipid peroxidation products and decrease of chlorophyll *a* content. Seed germination in presence of MPA reduces peroxidase activity in seeds, as well as barley viability and germination. The biochemical parameters under research can be used to develop methods biodiagnostics of natural environments contaminated with MPA.

Ключевые слова: метилфосфоновая кислота, семена ячменя, биоплёнки цианобактерий, пероксидаза, перекисное окисление липидов, хлорофилл *a*, жизнеспособность семян

Keywords: methylphosphonic acid, barley seeds, cyanobacteria biofilms, peroxidase, lipid peroxidation, chlorophyll *a*, seed viability

В настоящее время является актуальной проблема загрязнения окружающей среды токсичными органическими соединениями. Метилфосфоновая кислота (МФК) – фосфорорганический ксенобиотик, благодаря наличию в молекуле связи С–Р отличается повышенной персистентностью и сохраняется в почве десятилетиями [1]. МФК – это конечный продукт гидролиза изопропилового и пинаколилового эфира метилфосфоновой кислоты, которые образуются при разложении зарина и зомана [2, 3]. МФК является универсальным маркером фосфорорганических отравляющих веществ. Её содержание может быть отмечено вблизи объектов по уничтожению химического оружия (при эксплуатации, а также при аварийных сбросах), на сельскохозяйственных территориях, применявших средства защиты растений, имеющих в составе производные МФК (фосфорорганические пестициды). Ориентировочная допустимая концентрация метилфосфоновой кислоты в почве населённых мест районов размещения объектов по хранению и уничтожению химического ору-

жия составляет 0,22 мг/кг [4]. Класс опасности – 3 [4].

Растительные организмы являются удобными объектами для проведения биоиндикационных исследований. Ранее было показано, что МФК вызывает изменения на биохимическом уровне: активацию пероксидаз, накопление веществ с антиоксидантными свойствами, интенсификацию процессов перекисного окисления липидов в растительных тканях и усиление экзоосмоса электролитов из корней культурных и дикорастущих растений [5, 6].

МФК оказывает влияние на почвенную фототрофную микробиоту – водоросли и цианобактерии [7]. Установлено, что кислота стимулирует развитие цианобактерий, в которых заканчивается цикл превращения МФК. Для представителей микробиоты отмечены колебания длины мицелия и количества спорул [8]. МФК ($5 \cdot 10^{-4}$ –0,01 моль/л) оказывает токсическое действие на тест-культуру *Chlorella vulgaris* [9].

МФК вызывает снижение содержания гликогена в печени и мышцах лабораторных

мышей, олигопептидов в плазме и эритроцитной массе; увеличение содержания креатинфосфата, общего белка и активности лактатдегидрогеназы [10].

Целью работы было изучить ответные реакции фототрофных организмов на действие метилфосфоновой кислоты с перспективой разработки методов биодиагностики природных сред, загрязнённых поллютантом.

Объекты и методы

Объектами исследования были выбраны фототрофные организмы: цианобактерии (природные биоплёнки с доминированием *Nostoc commune*) и растения ячменя сорта Новичок.

Изучали токсичность МФК для цианобактерий (ЦБ) в широком диапазоне концентраций: $1 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $7,5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л. Данные биоплёнки отобраны у авто- и железной дороги в городе Дзержинске Кондаковой Л. В. в 2006 г. и хранились в сухом виде. В 2011 г. они были активизированы на среде Громова № 6 без азота. После этого видовой состав включал: *Nostoc commune*, *Nostoc punctiforme*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Plectonema nostocorum*. Возраст культуры – два месяца, перед опытом биоплёнки гомогенизировали.

Изучали влияние МФК на интенсивность процессов перекисного окисления липидов и уровень хлорофилла а в гомогенате биоплёнок водорослей. В гомогенат ЦБ (объём 0,7 мл) помещали водный раствор МФК (объёмом 3 мл), выдерживали в течение суток. Содержание хлорофилла а в гомогенате биоплёнок оценивали спектрофотометрически при длинах волн 665 и 750 нм [11]. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), образующимся в процессе ПОЛ. За основу была взята методика определения ПОЛ в растительных тканях [12], в нашей модификации.

Изучали эффекты водных растворов МФК (0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1 моль/л) на семена ячменя по показателям: активность пероксидаз в семенах, жизнеспособность семян, всхожесть семян. Опыты проводили в лабораторных условиях при температуре воздуха +22 °С, в трёхкратной повторности. Контроль – дистиллированная вода.

Активность пероксидаз оценивали по накоплению продуктов окисления гваякола [13]. Оценку жизнеспособности семян проводили

по методу, основанному на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать бесцветный раствор хлористого тетразола в фармезане [14]. Определение всхожести семян проводили по стандартной методике в чашках Петри в течение 7 дней [15].

Для приготовления растворов использовали метилфосфоновую кислоту фирмы Lancaster (Англия), содержащую 98% действующего вещества.

Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [16].

Результаты и обсуждение

Ответные биохимические реакции ЦБ на действие МФК

Цианобактерии рода *Nostoc* постоянно присутствуют в почвенных и водных экосистемах и часто становятся эдификаторами фототрофных микробных ценозов. Массовое развитие ностоков в природе делает их привлекательным объектом в исследованиях, связанных с биомониторингом антропогенно загрязнённых сред. Интерес вызывает возможность использования ЦБ этого рода в качестве организмов-индикаторов и тест-организмов на определённые виды загрязнения окружающей среды. Показано влияние поллютантов разной химической природы на биохимические показатели ЦБ [17].

В модельных опытах изучена токсичность разных концентраций МФК ($1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л) для ЦБ. Установлено, что МФК в концентрациях $1 \cdot 10^{-1}$ – $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л оказывала летальное действие на ЦБ, через сутки после инкубации с токсикантом отмечали разрушение хлорофилла и гибель клеток.

МФК в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л и ниже не вызывала гибели ЦБ, однако инициировала процессы ПОЛ в клетках (рис. 1). Известно, что действие неблагоприятных факторов на фототрофные организмы вызывает интенсификацию окислительных процессов, накопление активных форм кислорода, что приводит к окислительным повреждениям макромолекул. Ранее было показано, что поллютанты разной химической природы (тяжёлые металлы, хлорид натрия, трефлан, бензин) вызывают возрастание интенсивности процессов ПОЛ [18].

МФК в концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л вызывала накопление продукта ПОЛ в среднем на 20% по сравнению с контролем.



Рис. 1. Содержание хлорофилла a и малонового диальдегида в клетках ЦБ через сутки после инкубации на растворах метилфосфоновой кислоты

С ростом концентрации МФК отмечали существенное возрастание интенсивности процессов ПОЛ. Под влиянием МФК $5 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л уровень малонового диальдегида в клетках возрастал в 2,7–3,8 раза по сравнению с ЦБ, которые не подвергались обработке токсикантом.

Известно, что ПОЛ является одним из процессов разрушения мембранных липидов и приводит к нарушению функционирования клеток. По-видимому, летальное действие на клетки ЦБ высоких концентраций МФК $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л и выше происходит в результате окислительной деградации органических макромолекул, в том числе и мембран.

МФК вызывала снижение содержания хлорофилла a в клетках ЦБ. Под влиянием МФК в концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ – $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л уровень хлорофилла снижался в среднем на 17% по сравнению с контролем. Действие МФК в более высоких концентрациях приводило к серьёзным нарушениям в пигментном комплексе, концентрация хлорофилла снижалась на 30–50% по сравнению с контрольным уровнем.

Выявлена тесная отрицательная корреляция между данными по интенсивности процессов ПОЛ и результатами по содержанию хлорофилла a в клетках ЦБ ($r = -0,83$). Снижение содержания хлорофилла в клетках цианобактерий в присутствии МФК, вероятно, является следствием окислительной деградации мембранных липидов и угнетения про-

цессов биосинтеза хлорофилла в стрессовых условиях.

Ответные биохимические реакции семян ячменя сорта Новичок на действие МФК

Семена растений в отсутствие воды и при низкой температуре находятся в состоянии вынужденного покоя, однако с возрастанием оводнённости в семенах активируются основные метаболические процессы, повышается интенсивность дыхания [19]. Период прорастания делится на три этапа: 1) активация метаболизма (этап физического набухания); 2) подготовка к началу роста растяжением (наклёвывание семян за счёт перехода к растяжению клеток осевых органов зародыша); 3) собственно рост органов проростка [20]. Набухание и прорастание семян всегда сопровождается активированием окислительных процессов. Дегидрогеназы и пероксидазы участвуют в адаптационных механизмах растений, произрастающих в экстремальных условиях. При этом ферменты необходимы прежде всего для сохранения жизнеспособности семян и при запуске процессов, связанных с их прорастанием [21].

Установлено, что прорастание семян в присутствии МФК в изучаемом диапазоне концентраций (0,01–0,1 моль/л) сопровождалось изменением активности ферментов оксидоредуктаз. В ходе эксперимента была выявлена тесная корреляция ($r = 0,99$) между активностью пероксидаз в семенах и жизн-

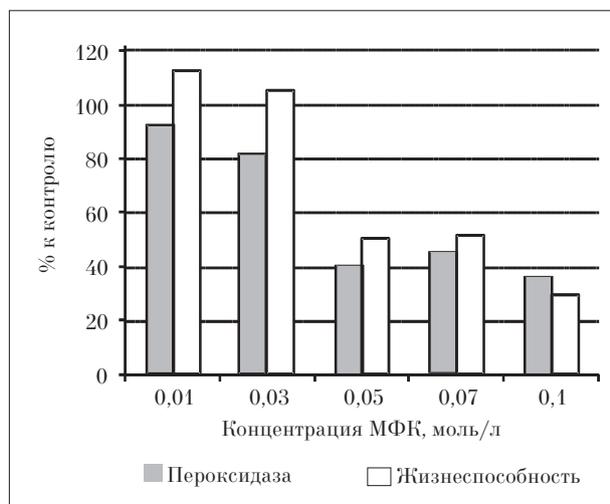


Рис. 2. Влияние метилфосфоновой кислоты на активность пероксидаз и жизнеспособность семян

неспособностью семян, которую оценивали по активности дегидрогеназ (рис. 2).

МФК в концентрациях 0,01 и 0,03 моль/л вызывала снижение активности пероксидаз в семенах ячменя на 8–15%, жизнеспособность семян (активность дегидрогеназ), напротив, незначительно возрастала. Более высокие концентрации МФК 0,05-0,1 моль/л приводили к существенному снижению активности пероксидаз и жизнеспособности семян ячменя.

Пероксидаза – стрессовый фермент растений, который участвует в метаболических процессах, происходящих во время покоя семян и в период их активного прорастания. Фермент является показателем протекания аэробных метаболических процессов в семенах, а его активность увеличивается при их прорастании [22]. Угнетение пероксидаз в семенах под влиянием МФК свидетельствует о снижении активности антиоксидантной системы и коррелирует с понижением жизнеспособности зерновок.

Биохимические изменения, вызванные присутствием МФК в среде для проращивания семян, привели к снижению их всхожести на 7-е сутки эксперимента. Всхожесть семян при действии МФК в концентрации 0,02 и 0,04 моль/л была ниже, чем в контроле, на 25% и 60% соответственно. МФК в более высоких концентрациях (0,06 и 0,1 моль/л) вызывала гибель семян.

Заключение

Метилфосфоновая кислота является одним из фосфорорганических поллютантов, устойчивых к разложению в окружающей сре-

де. Перспективным является направление разработки экспрессных методов биодиагностики природных сред на присутствие МФК. Известно, что в первую очередь на действие неблагоприятных факторов реагируют ферментные системы, происходят изменения в про/антиоксидантной системе клеток. Для опытов были использованы многовидовые природные биоплёнки с доминированием *Nostoc commune*, которые повсеместно встречаются в природе. В модельных опытах на природных биоплёнках показано, что в течение суток происходит значительное возрастание интенсивности процессов ПОЛ. Выявлена чёткая зависимость между концентрацией МФК и накоплением продукта ПОЛ – малонового диальдегида в клетках ЦБ. Активация окислительных процессов в клетках ЦБ сопровождалась нарушениями в пигментном комплексе – снижении уровня хлорофилла *a*. Изученные показатели – интенсивность ПОЛ и содержание хлорофилла *a* в клетках ЦБ – могут быть использованы для экспресс-диагностики загрязнения природных сред МФК.

В опытах на семенах ячменя было изучено влияние МФК на активность антиоксидантного фермента – пероксидазы и жизнеспособность семян. Показано, что инкубация семян в течение суток на растворах МФК в концентрациях 0,01 и 0,03 моль/л не вызывает угнетение данных показателей. Более высокие концентрации МФК приводят к снижению активности фермента и жизнеспособности семян. В результате длительного (7 суток) выдерживания семян на растворах МФК в концентрациях 0,06 моль/л и выше происходят необратимые изменения в функциональном состоянии семян, что приводит к их гибели.

Для диагностики загрязнения природной среды МФК целесообразно использовать показатели состояния антиоксидантной системы фототрофных организмов, которые быстро реагируют на присутствие в среде неблагоприятного фактора.

Литература

1. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А., Радиллов А.С., Пшеничная Г.В. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии // Российский химический журнал. 2002. Т. 46. № 6. С. 82–91.
2. Франке З. Химия отравляющих веществ. М.: Химия, 1973. Т. 1. 440 с.

3. Александров В.Н., Емельянов В.И. Огравляющие вещества. М.: Военное издательство, 1990. 320 с.
4. ГН 2.1.7.2609 – 10. «Ориентировочная допустимая концентрация (ОДК) метилфосфоновой кислоты в почве населённых мест районов размещения объектов по хранению и уничтожению химического оружия».
5. Огородникова С.Ю., Головки Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакции растений на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновою кислоту. Сыктывкар, 2004. 24 с.
6. Огородникова С. Ю., Головки Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакции растений на действие метилфосфоновой кислоты // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 1. С. 78–83.
7. Ашихмина Т.Я., Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю. Метилфосфоновая кислота как регулятор биологических процессов в экологических системах: действие на микроорганизмы, ферментативную активность и высшие растения // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 2. С. 78–87.
8. Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю., Ашихмина Т.Я. Инварианты организации фототрофных микробных сообществ дерново-подзолистой почвы при действии метилфосфоновой кислоты // Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга: научный и образовательный аспекты: Материалы Всерос. науч. школы. Киров: «Старая Вятка». 2005. С. 62–65.
9. Панфилова И. В., Бородин Н. В., Ашихмина Т. Я. Изучение воздействия различных концентраций метилфосфоновой кислоты на *Chlorella vulgaris* // Экология родного края: проблемы и пути решения: Материалы I областной науч.-практич. конф. молодёжи. Киров: Типография «Старая Вятка», 2006. С. 157.
10. Плотникова О. М., Матвеев Н. Н., Корепин А. М., Дуплякина И. В. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 1. С. 81–86.
11. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. Institute of Marine Research, Norway, 2000. 25 p.
12. Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
13. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
14. ГОСТ 12039-82 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения жизнеспособности.
15. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести
16. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
17. Домрачева Л.И., Фокина А.И., Огородникова С.Ю., Зыкова Ю.Н., Кондакова Л.В. Адаптационные реакции микроорганизмов на стрессовые воздействия // Особенности урбоэкосистем подзоны южной тайги Европейского Северо-Востока / Под ред. Т.Я. Ашихминой, Л.И. Домрачевой. Киров: Изд-во ВятГГУ, 2012. С. 180–231.
18. Огородникова С.Ю., Зыкова Ю.Н., Березин Г.И., Домрачева Л.И., Калинин А.А. Реакция различных видов цианобактерий рода *Nostoc* на действие токсикантов // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах: Материалы международной научно-практической конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения проф. Э.А. Штиной. Киров: Вят.ГСХА, 2010. С. 216–221.
19. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л., 1985. 348 с.
20. Обручева Н.В., Антипова О.В. Физиология инициации прорастания семян // Физиология растений. 1997. Т. 44. № 2. С. 287–302.
21. Рогожин В.В. Физиолого-биохимические механизмы формирования гипобиотических состояний высших растений: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Иркутск. 2000. 59 с.
22. Верхотуров В.В. Физиолого-биохимические процессы в зерновках ячменя и пшеницы при их хранении, прорастании и переработке: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва. 2008. 40 с.