

На основании полученных результатов рассчитаны значения показателей для ранжирования образца отходов по классам опасности (табл. 4). Полученные результаты по оценке эмбриотоксичности на кладках *L. stagnalis* согласно установленным критериям (табл. 5) позволяют отнести протестированный образец отходов производства ко 2-му классу опасности опасных отходов (очень опасным) [5].

Таблица 4 – Параметры эмбриотоксичности отходов на кладках *L. stagnalis*

Показатель	Результат	Класс опасности
EC <sub>50</sub> , мг/мл	0,75±0,04	2 класс
Пороговая концентрация (EC <sub>15</sub> ), мг/мл	0,23	3 класс

Таблица 5 – Критерии отнесения отходов к классам опасности по показателям эмбриотоксичности на кладках *L. stagnalis*

Показатель	Классы опасности отходов			
	1-й класс	2-й класс	3-й класс	4-й класс
EC <sub>50</sub> , мг/мл	менее 0,1	0,1 – 1,0	1,1 – 20	более 20
Пороговая концентрация (EC <sub>15</sub> ), мг/мл	менее 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup> – <10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup> – 0,5	более 0,5
EC <sub>50</sub> /EC <sub>15</sub>	более 10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> – >10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> – 10	–

Таким образом, на основании проведенных исследований испытуемый образец отходов отнесен ко второму классу опасности, поскольку ранжирование отходов по классам опасности проводится по лимитирующему (наиболее жесткому) показателю – в данном случае по показателю эмбриотоксичности, определяемому с применением тест-системы *L. stagnalis*.

Следовательно, применение тест-систем, представленными батареями беспозвоночных животных, позволяет оценить степень опасности исследуемых образцов отходов для окружающей природной среды в ее основных и тесно взаимосвязанных составляющих – почвенной и водной компонентах. Кроме того, данный подход экономически целесообразен, не представляет существенных методических сложностей при его реализации, поэтому его применение при экотоксикологических исследованиях весьма актуально.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Волкович, А. И. Утилизируем ртутьсодержащие отходы правильно / А. И. Волкович // Экология на предприятии : производственно-практический журнал для экологов. – 2018. – № 10 (88). – С. 44–48.
2. Гринин, А. С., Новиков, В. Н. Промышленные и бытовые отходы. – М.: Фаир-Пресс, 2002. – 336 с.
3. Куксов, С. В. Полигоны твердых бытовых и промышленных отходов / С.В. Куксов [и др.] // Вестник АГТУ. – 2005. – № 3 (26). – С. 185–189.
4. Криштопенко, С. В. Доза-эффект / С. В. Криштопенко, М. С. Тихов, Е. Б. Попова. – М. : Медицина, 2008. – 288 с.
5. Метод экспериментального определения токсичности отходов производства : инструкция : утв. постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 07.04.2016, № 044-1215. – Введ. 20.06.2016. – Минск, 2015. – 56 с.

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АДАПТАЦИИ АГРОЦЕНОЗОВ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ И РАДИОНУКЛИДАМИ PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL METHODS OF ASSESSMENT ADAPTATION OF AGROECOSYSTEM TO THE POLLUTION WITH HEAVY METALS AND RADIONUCLIDES

**В. Ф. Ковалев, Е. В. Журавков, Н. В. Гончарова**  
**V. Kavaliou, Y. Zhuravkov, N. Goncharova**

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь  
goncharova@iseu.by  
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Выявлены наиболее чувствительные и информативные показатели, которые могут быть использованы для оценки техногенного загрязнения компонентов окружающей среды. Показано, что при действии низких доз поллютантов содержание фотосинтетических пигментов повышается, а при увеличении концентрации

поллютанта – снижается. Установлено, что возрастание антропогенной нагрузки приводит к усилению перекисного окисления липидов у изученных растений и формированию ответных реакций, связанных с возрастанием количества водорастворимых антиоксидантов. На основе теоретических и экспериментальных исследований, проведенных в рамках данного исследования, сформулированы основные научно-методологические подходы к разработке стратегии формирования агроценозов и прогнозирования их устойчивости.

The most sensitive and informative indicators that can be used to assess the anthropogenic pollution of environmental components are identified. It is shown that under the action of low doses of pollutants, the content of photosynthetic pigments may increase, and with an increase in the concentration of the pollutant – decreases. It was found that the increase in anthropogenic load leads to increased lipid peroxidation in the studied plants and the formation of responses associated with an increase in the amount of water-soluble antioxidants. On the basis of theoretical and experimental studies of this study, the main scientific and methodological approaches to the development of strategies for the formation of agroecosystems and forecasting their stability.

*Ключевые слова:* токсиканты, хлорофилл, каталаза, антропогенное воздействие, пероксидаза, агроэкосистема.

*Keywords:* toxicants, chlorophyll, catalase, anthropogenic impact, peroxidase, agroecosystem.

Среди химических веществ, загрязняющих различные объекты окружающей среды (воздух рабочей зоны, атмосферный воздух, водоемы, почву, пищевые продукты), тяжелые металлы (ТМ) и их соединения образуют значительную группу токсикантов, во многом определяющую антропогенное воздействие на экологическую структуру окружающей среды и на самого человека. Развитие атомной промышленности, испытание ядерного оружия, аварии на атомных реакторах различного происхождения приводят к локальным повышениям уровня воздействующих радиационных доз и к глобальному повышению радиационного фона, загрязнению окружающей среды радионуклидами.

Цель исследований – изучение действия загрязнения почвы радионуклидами ( $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$ ) и тяжелых металлов (кадмий) на изменения активности ферментов каталазы и пероксидазы, а также фотосинтетической активности озимой пшеницы. Проведено две серии лабораторных экспериментов на вегетирующих растениях озимой пшеницы сорта Этюд. Растения выращивали в сосудах (масса почвы – 5 кг), в контролируемых условиях, при температуре +24 °С, освещенности 18–20 кЛк, с соблюдением правил проведения вегетационного опыта. Повторность опыта четырехкратная. Почва – дерново-подзолистая супесчаная с агрохимическими: рН 5,03–5,08, содержание гумуса – 1,6, фосфора – 22,1–37,7 мг в 100 г почвы, калия – 21,0–27,3 мг в 100 г почвы. Удельная радиоактивность загрязненной радионуклидами почвы составляла:  $^{137}\text{Cs}$  – 1920 Вк/кг и  $^{90}\text{Sr}$ –182 Вк/кг. Контроль – почва, не загрязненная радионуклидами. Известно, что общая продуктивность растений связана с фотосинтезом – процессом, характеризующимся тонко слаженной работой ферментов и соединений, аккумулирующих и трансформирующих световую энергию, поглощенную хлорофиллом, в макроэргические соединения.

Анализ количественного содержания хлорофиллов а и b показал, что с ростом в удельной активности вегетативной массы растений содержание хлорофилла а+b увеличивается в вариантах выращивания их на почве, загрязненной радионуклидами, по сравнению с контрольными вариантами (табл. 1).

*Таблица 1 – Влияние радионуклидов на биосинтез хлорофилла у растений озимой пшеницы*

Вариант	Концентрация хлорофилла, [нмоль/г. сухой массы]			
	Хлорофилл а	Хлорофилл b	Хлорофилл а+b	Хлорофилл а/b
Озимая пшеница (сорт Этюд)				
Контроль (без РН)	78,6±0,02	30,9±0,03	108,9±0,04	2,6
Опыт (с РН)	92,2 ±0,01	34,3±0,03	126,5±0,04	2,7

Следует отметить, что обнаруженная стимуляция биосинтеза хлорофилла происходит на фоне снижения активности фермента каталазы (табл. 2).

Активность каталазы снижалась во всех 4-х повторностях опыта. Увеличение концентрации хлорофилла и снижение активности каталазы в листьях растений, содержащих радионуклиды, сопровождалось снижением количества растворимого белка.

*Таблица 2 – Изменение биосинтеза белка и фотосинтетической активности листьев озимой пшеницы под влиянием инкорпорированных радионуклидов*

Вариант	Белок (мкг/г сухой массы листа)	Активность каталазы (оносительные ед.)	Включение $^{14}\text{C}$ в ткань листа (относительные ед.)
Озимая пшеница (сорт Этюд)			
Опыт/контроль	0,72±0,04	0,87±0,07	1,48±0,05

Изучая суммарный процесс пероксидации липидов, было установлено, что содержащее МДА в листьях опытных вариантов всех исследуемых растений превышает эту величину у контрольных растений (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние инкорпорированных в листья радионуклидов на содержание малонового диальдегида (МДА) и активность пероксидазы у растений озимой пшеницы

Вариант	МДА (мкг/г сухой массы)		Пероксидаза (относит. единицы)	
		опыт/контроль		опыт/контроль
Озимая пшеница (сорт Этюд)				
Контроль (без РН)	0,67±0.3	1	98,5±1,1	1
Опыт (с РН)	0,76±0.2	1,13±0,02	122,4±1,4	1,24±0,03

Радионуклиды, поступившие из почвы в листья исследуемых растений, активируют пероксидацию липидов и активность пероксидазы в клеточных мембранах листьев, что позволяет предположить существование антиоксидантных систем защиты при действии стрессовой ситуации. С увеличением активности пероксидазы, активность фотосинтетических процессов возрастала.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном эффекте стимуляции под воздействием инкорпорированных радионуклидов. На основании имеющихся представлений можно предположить, что радионуклиды, воздействуя на клеточные мембраны, способствуют развитию окислительных процессов, приводящих к изменению состояния и свойств мембран, вызывая активацию фотосинтетических реакций.

В результате исследований выявлены наиболее чувствительные и информативные показатели (активность фотосинтетических и антиоксидантных систем), которые могут быть использованы для оценки техногенного загрязнения компонентов окружающей среды.

Во второй серии модельных опытов исследовали действие хлористого кадмия ( $10^{-6}$  –  $10^{-2}$  М) на озимую пшеницу сорта Этюд при добавлении в среду выращивания. Увеличение концентрации этой соли приводило к замедлению роста растений, уменьшению содержания белка и хлорофилла в листьях и снижению скорости синтеза АТФ в изолированных хлоропластах. При избытке аммония ( $2,5 \times 10^{-2}$  М) и длительном действии меньших концентраций ( $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М) увеличивалась активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в листьях и корнях. Сравнение растворимых (цитозольных) и труднорастворимых (мембранных) белковых фракций, а также субклеточных структур, выделенных из проростков, показало активирование ферментов хлористым аммонием преимущественно в мембранных структурах – ядрах, субчастицах, митохондриях и хлоропластах. Загрязнение окружающей среды делает необходимым изучение трансформации вредных соединений (тяжелых металлов и радионуклидов) в растениях, выявление первичных мишеней воздействия, метаболических и детоксикационных путей их в живой клетке.

К настоящему времени накоплен достаточно обширный материал, показывающий неспецифическое действие любых поллютантов на клетку, проявляющуюся в активировании перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клеточных мембранах, образовании активных форм кислорода (АФК), индуцирующих свободно-радикальные механизмы и провоцирующих окислительные стрессы [1; 2]. К АФК относят: очень токсичные – гидроксильный радикал (ОН), гидроксид ион радикал (ОН<sup>-</sup>) и супероксидрадикал (O<sup>2-</sup>) и менее токсичные – гидроксид ион кислорода (НО<sup>2-</sup>) и перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [3]. В живых клетках, в том числе и растительных, существуют механизмы противостоящие окислительному стрессу, так называемые антиоксидантные системы, включающие ферменты и низкомолекулярные соединения. Ключевыми ферментами можно рассматривать супероксиддисмутазу, каталазу и пероксидазу, связанных последовательно механизмом каталитического действия. Супероксиддисмутаза (СОД), КФ 1.15.11 осуществляет дисмутацию супероксидного радикала до перекиси водорода и кислорода, каталаза (КАТ), КФ 1.11.1.6 разрушает перекись водорода на воду и кислород [4], а пероксидаза (ПО), КФ 1.11.1.7 окисляет широкий спектр восстановителей с участием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5]. Совместное действие этих ферментов с низкомолекулярными антиоксидантами, такими как альфа – токоферол (витамин Е), восстановленный глутатион, аскорбат и др., обеспечивает защиту от АФК в живых организмах.

В литературе сообщается об активации ферментов – СОД и КАТ или ПО при увеличении адаптационных возможностей растений в различных неблагоприятных условиях, в том числе и при действии ксенобиотиков, однако не представлены данные об одновременной активации всех трех ферментов при действии токсичных концентраций загрязнителей. Сопоставление этих активностей в растениях в различных неблагоприятных условиях помогло бы разрешить вопрос об использовании их в биотестировании, который дискутируется в специальной литературе. С другой стороны, активация СОД и ПО может указывать на развитие окислительного процесса, особенно в случае фермента пероксидазы. Каталитический механизм действия этого фермента не является однозначно антиоксидативным. В последнее время ПО приписывают не только защитную роль от АФК, но и окислителя при детоксикации чужеродных соединений. Вопрос этот интересен в связи выявления первичных мишеней воздействия ксенобиотиков на растения и разработки биохимических тестов для обнаружения загрязнения окружающей среды. С этой целью в настоящей работе исследовали активность СОД, КАТ и ПО в озимой пшенице при добавлении в среду выращивания хлористого аммония в широком диапазоне концентраций, включая токсические. Проведен анализ изменения активности каждого фермента в разных частях растения – листьях и корнях, в субклеточных мембранных структурах и фракциях растворимых (цитозольных) и мембранных белков. Озимую пшеницу сорта Этюд выращивали в почвенной или водной культуре, при естественном освещении и температуре 22–27 °С. Полив и смену среды гидропоники проводили два раза в неделю. Хлористый кадмий ( $10^{-6}$ – $10^{-2}$  М) добавляли в среду (или в почву при поливе) в течение всей вегетации. Концентрация соли в каждом опыте различа-

лась десятикратно. Опыты с каждой концентрацией проводили в 2-х или 4-х кратной повторности. Растительный материал для выделения белков и субклеточных фракций отбирали через 12; 14; 27; 35 и 70 сут. Выращивание озимой пшеницы в присутствии хлористого кадмия в диапазоне испытанных концентраций  $10^{-6}$ – $10^{-2}$  М показывало заметное влияние на рост и развитие растений в течение вегетационного периода. Действие меньших концентраций –  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М, проявлялось в замедлении роста надземных частей и корней, которое отмечалось через 3–4 недели выращивания. По мере развития растений наблюдали разрастание мочковатой корневой системы пожелтение листьев. В водной культуре такие нарушения появлялись раньше, чем в почвенной. Высокие концентрации  $\text{CdCl}_2$  –  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  М, оказывали губительное действие на озимую пшеницу в первые недели выращивания. Двухнедельные проростки озимой пшеницы, выращенные при указанных концентрациях кадмия в водной культуре, отставали в росте в 1,5–3 раза и содержали меньше белка и хлорофилла в листьях, по сравнению с контрольным вариантом. Надземная часть у таких растений желтела и погибала к концу третьей, а корни – к концу четвертой недели. В почвенной культуре растения гибли через 1,5–2 месяца. Как оказалось, морфометрические повреждения в озимой пшенице, вызванные высокими концентрациями кадмия, сопровождалось усилением активностей антиоксидантных ферментов в листьях и корнях озимой пшеницы. Увеличение концентрации хлористого кадмия в среде выращивания озимой пшеницы сорта Этюд привело к замедлению роста растений, уменьшению содержания белка и хлорофилла в листьях и снижению скорости синтеза АТФ в изолированных хлоропластах. При избытке кадмия ( $2,5 \times 10^{-2}$  М) и длительном действии меньших концентраций ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М) увеличивалась активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в листьях и корнях.

Сравнение растворимых (цитозольных) и труднорастворимых (мембранных) белковых фракций, а также субклеточных структур, выделенных из проростков, показало активирование ферментов хлористым аммонием преимущественно в мембранных структурах – ядрах, субчастицах, митохондриях и хлоропластах. В хлоропластах ПОЛ в стрессовых условиях протекает весьма активно т.к. идет образование большого количества синглетного кислорода и пероксида водорода. Специфический липидный состав фотосинтетических мембран, включающий 75 % электронейтральных галактолипидов, 15 % фосфолипидов и 10 % сульфолипидов с большим содержанием ненасыщенных жирных кислот, обуславливает высокую скорость ПОЛ. Изменение конечных продуктов ПОЛ является одним из наиболее известных и доступных методов оценки структурных повреждений в растениях. Активные формы кислорода вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот с образованием 4-гидроксинонена и малонового диальдегида (МДА). Эти продукты являются биотестами окислительного стресса. Предложен простой и дешевый способ тестирования устойчивости агроценоза к воздействию окислительного стресса путем колориметрической реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и спектрофотометрической оценкой уровня ПОЛ.

На основе проведенных исследований выявлены наиболее чувствительные и информативные показатели, которые могут быть использованы для оценки техногенного загрязнения компонентов окружающей среды. К таким показателям можно отнести: характеристики пигментного аппарата: в модельных условиях при действии низких доз поллютантов содержание фотосинтетических пигментов может повышаться, а при увеличении концентрации поллютанта – снижается. Показано, что возрастание антропогенной нагрузки приводит к усилению перекисного окисления липидов у изученных растений и формированию ответных реакций, связанных с возрастанием количества водорастворимых антиоксидантов. На основе теоретических и экспериментальных исследований, проведенных в рамках данного исследования, сформулированы основные научно-методологические подходы к разработке стратегии формирования агроценозов и прогнозирования их устойчивости.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Мальхотра, С. С., Хан, А. А.* Биохимическое и физиологическое действие приоритетных загрязняющих веществ // Загрязнение воздуха и жизнь растений / С. С. Мальхотра, А. А. Хан; под ред. Майкла Трешоу. – Л.: Гидрометеиздат, 1988. (Air Pollution and Plant Life / Edited by Michael Treshow. Utah, USA, Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City. 1986).
2. *Дурмишидзе, С. В.* Биохимия растений и охрана окружающей среды / С. В. Дурмишидзе // Биотрансформация ксенобиотиков в растениях / Ред. О. Т. Хачидзе. – Тбилиси: Мецниере-ба, 1988.
3. *Скулачов, В. П.* Старение организма – особая биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы: биохимическое обоснование гипотезы Вейсмана / В. П. Скулачов // Биохимия. – 1997. – Т. 62. Вып. 11.
4. *Фридович, И.* Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода / И. Фридович // Свободные радикалы в биологии / под ред. У. Прайер. – М.: Мир, 1979. – Т. 1. (Free Radicals in Biology / Edited by William A. Pryor. New York San Francisco. London: Acad. Press, 1976).
5. *Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., Greppin, H.* Peroxides. 1970–1980: A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. Geneve, Switzerland: Univ. De Geneve, Centre de Botanique. 1982.