

ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АЦИДОФИЦИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ

А.И. Соколик, Н.В. Кабанова, Ю.А. Сорока, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

В связи с все возрастающим использованием тяжелых металлов в производстве возрастает их эмиссия, в результате экосистемы все больше загрязняются. Проблема усугубляется тем, что в отличие от других промышленных отходов тяжелые металлы не разлагаются и уровень их содержания в среде со временем только возрастает. Поступив в экосистему тяжелые металлы, в конечном счете, накапливаются в почве, откуда по трофическим цепочкам переходят от растений к животным и попадают в организм человека. Оказавшись в почве, эти металлы воздействуют, прежде всего, на корни растений, затем, переместившись в надземную часть – на остальные органы и ткани растительного организма.

Одна из важнейших функций корневой системы растения состоит в поглощении из почвы минеральных элементов и обеспечение ими в достаточном количестве всех важнейших процессов жизнедеятельности. Таким образом, от состояния ион-транспортных систем клеток корня существенно зависит рост, развитие и продуктивность растения. Задача настоящей работы – выявить основные особенности действия весьма опасных загрязнителей окружающей среды – кадмия и свинца – на один из индикаторных процессов состояния минерального питания растений – ацидофицирующую активность корней.

Объект и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали корни интактных проростков ячменя сорта Дивосны, пшеницы Росстань и фасоли Рант; выращивание проводили в водной культуре рулонным методом по Журбицкому до возраста 7-9 дней [1]. Скорость работы H^+ -насосов (интенсивность ацидофикации) оценивали по изменению pH среды с помощью иономера, с использованием методики потенциометрического титрования раствором едкого натра. Измерения проводили при постоянном значении pH среды равном 7,0. Общая схема установки по измерению ацидофицирующей способности корней проростков изображена на рисунке 1 А.

После периода выращивания в водной культуре проростки погружали в дистиллированную воду на 5-6 секунд для удаления кислых выделений с поверхности корней. В начале опыта в течении 60 - 90 минут измеряли выход ионов водорода в контрольный раствор, содержащий 10^{-4} моль/л кальция сернокислого. Затем помещали корни проростков в тот же раствор с добавлением выбранной концентрации тяжелого металла и после получаса инкубации проводили измерение скорости ацидофикации. Последнее повторяли несколько раз до получения стационарного значения скорости ацидофикации (наклона кривой к оси времени, как показано на рисунке 1 Б). После этого возвращали корни в контрольный раствор и повторяли измерения несколько раз (отмыв). Минимальное временное разрешение методики, таким образом, составляло 30 - 60 мин.

Результаты и их обсуждение

Результаты экспериментов по влиянию свинца на скорость ацидофикации среды корнями проростков ячменя, пшеницы и фасоли приведены на рисунках 2 - 4. По данным, представленным на рисунке 2 А, видно, что по мере возрастания концентрации металла в растворе скорость выделения H^+ корнями ячменя убывает. Время развития эффекта

ингибирования уменьшается с ростом концентрации свинца в диапазоне от $15 \cdot 10^{-10}$ до $2 \cdot 10^{-9}$ моль/л. Скорость этого убывания, которую можно характеризовать промежутком времени, в течении которого подкисление замедляется наполовину, изменяется с концентрацией свинца: по мере роста концентрации время половинного ингибирования существенно убывает. Следует отметить отсутствие обратимости эффекта – скорость ацидофикации не восстанавливается после удаления свинца из раствора за время суток и более.

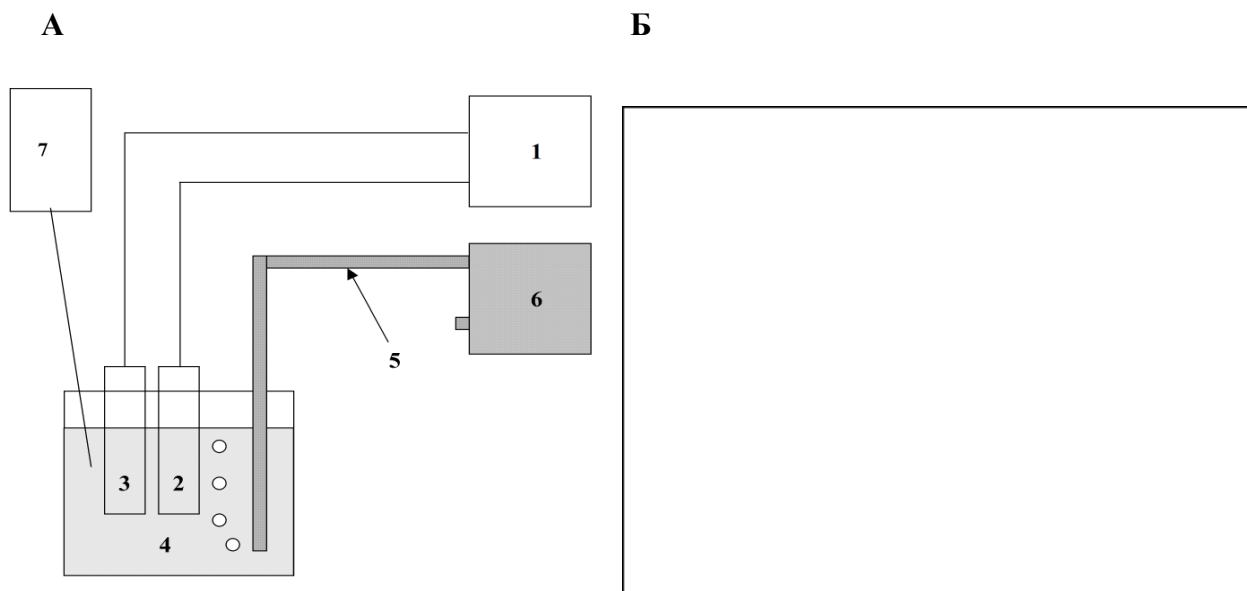


Рисунок 1 – А – схема установки для регистрации ацидофицирующей активности корней проростков:

1 – рН-метр; 2 – рН-электрод; 3 – электрод сравнения; 4 – кювета с раствором, куда помещаются корни проростков; 5 – шланг, подающий воздух в кювету от воздушного насоса; 6 – воздушный насос; 7 – бюретка для титрования раствором щелочи

Б – типичная временная зависимость изменения концентрации ионов водорода в растворе, рассчитанная по величине добавок щелочи в ходе потенциометрического титрования раствора с корнями

Концентрационные зависимости параметров ингибирования ацидофицирующей активности показаны на рисунке 2 Б. Обе зависимости (время половинного ингибирования и величина самого эффекта) имеют S - образный характер. Изменения обоих параметров происходят в очень узком концентрационном диапазоне – от $3 \cdot 10^{-10}$ до $7 \cdot 10^{-10}$ моль/л свинца. Концентрации половинного эффекта обеих зависимостей заметно различаются и составляют величины $(5 \div 5,5) \cdot 10^{-10}$ и 10^{-9} моль/л соответственно.

Можно отметить одну особенность действия свинца на ацидофицирующую активность корней ячменя, которая видна по данным рисунка 2 А, зависимость 3. Здесь видно заметное, до 80 %, снижение интенсивности ацидофикации, которое происходит в течении первых двух часов после начала воздействия свинца в концентрации 10^{-9} моль/л. Затем наблюдали достоверное восстановление активности до уровня 80 % от исходной, после чего происходило окончательное медленное падение активности практически до нулевого уровня.

Отметим, что этот эффект временной «реабилитации» не отмечался ни при более низкой ($7 \cdot 10^{-10}$), ни при более высокой ($3 \cdot 10^{-10}$ моль/л) концентрации металла в среде.

Можно выделить еще одну важную особенность временного хода ингибирования ацидофицирующей активности корней ячменя свинцом, очевидную из зависимостей, представленных на рисунке 2 А. При малых концентрациях свинца (зависимости 1 и 2) ингибирование после некоторой задержки (несколько часов) развивается медленно, за время порядка десятков часов. При средней концентрации (10^{-9} моль/л, зависимость 3), происходит быстрое падение активности, затем описанная выше «реабилитация», после чего активность

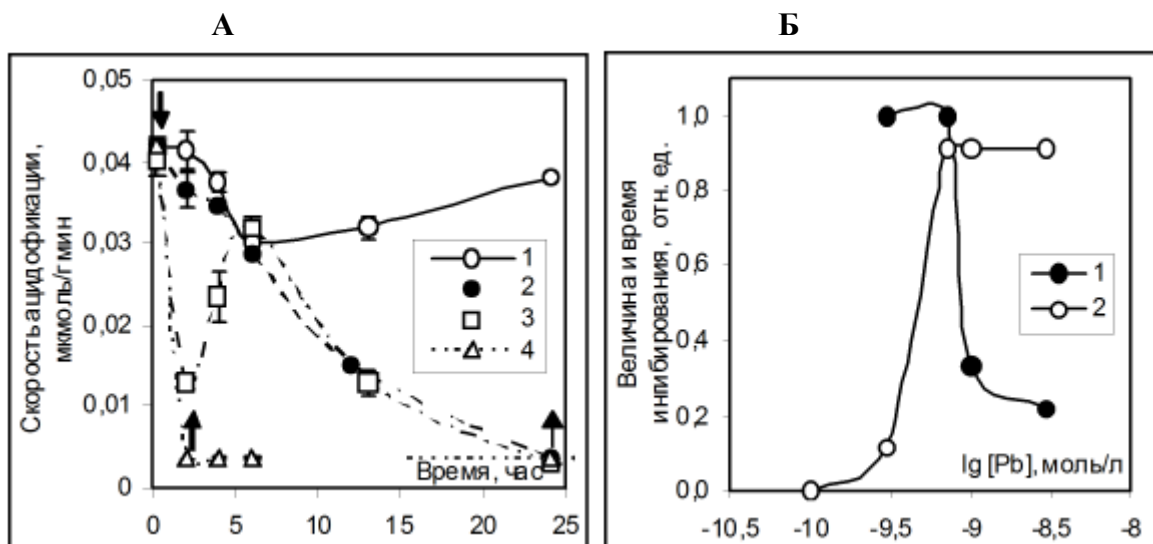


Рисунок 2 – Действие свинца на ацидофицирующую активность корней проростков ячменя:

А – Временной ход эффекта ингибирования при различных концентрациях металла, 1, 2, 3 и 4 – соответственно (моль/л): 3×10^{-10} ; 7×10^{-10} ; 10^{-9} и 3×10^{-9} . Стрелками, обращенными вверх, обозначен момент добавления металла к раствору. Стрелки направленные вверх, показывают момент удаления свинца из среды, отмыв

Б – Концентрационная зависимость времени половинного ингибирования (1) и стационарной величины эффекта подавления ацидофицирующей активности (2)

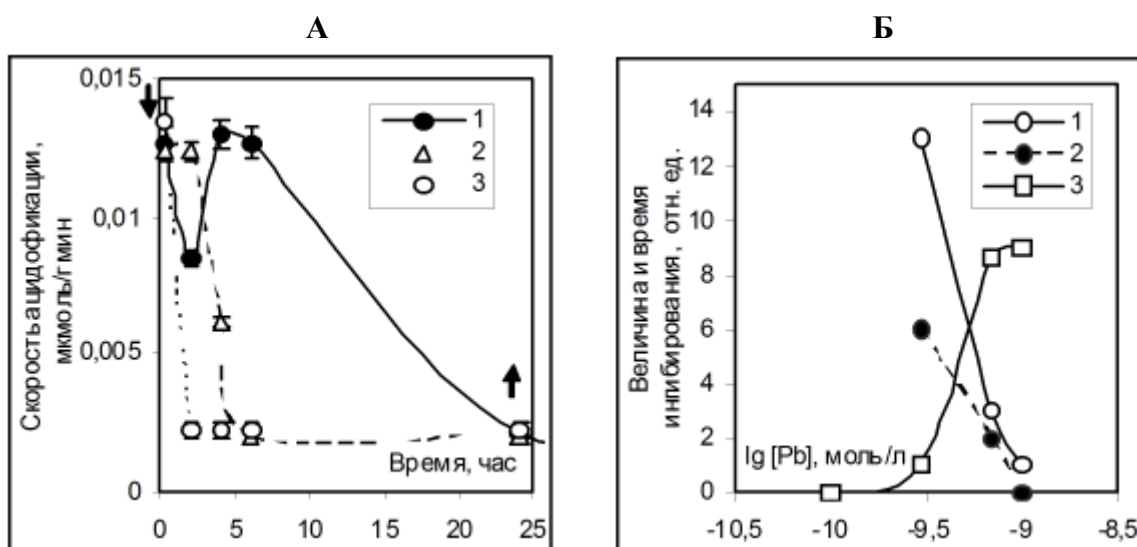


Рисунок 3 – Действие свинца на ацидофицирующую активность корней проростков пшеницы:

А – Временной ход эффекта ингибирования при различных концентрациях металла, 1, 2 и 3 – соответственно (моль/л): 3×10^{-10} ; 7×10^{-10} и 10^{-9} . Стрелка, обращенная вверх, обозначает момент добавления металла к раствору. Стрелки направленные вверх, обозначают момент устранения свинца из среды, отмыв

Б – Концентрационные зависимости времени половинного ингибирования, задержки начала эффекта (кривые 1, 2, по вертикальной оси отложены часы) и стационарной величины подавления ацидофицирующей активности (3, отн. единицы, умноженные на 10)

медленно спадает практически до нуля. При дальнейшем повышении уровня металла до 3×10^{-9} моль/л зарегистрирован только быстрый эффект без «реабилитации». Таким образом, возможно, мы имеем дело с двумя процессами, приводящими к подавлению ацидофицирующей активности корней, которые инициируются наличием свинца в среде и проявляются как быстрый и медленный.

Результаты аналогичных экспериментов с корнями проростков пшеницы показаны на рисунке 3 А. Качественно результаты подобны рассмотренным выше данным для ячменя. Здесь также имеет место подавление ацидофицирующей активности, возрастающее по мере роста концентрации металла в среде. Подобен и временной ход снижения скорости ацидофикации: при действии металла здесь также обнаруживается задержка ингибирования. Величина задержки убывает с концентрацией свинца от значения 6 часов до нуля. Для самой низкой из испытанных концентраций свинца – 3×10^{-10} моль/л – задержка может быть связана с «реабилитацией», отмеченной выше для случая корней ячменя. На рисунке 3 А, зависимость 1, видно статистически достоверное первоначальное быстрое падение скорости ацидофикации на 40 %, за которым следует ее полное восстановление до первоначального уровня. И только после этой задержки начинается медленный спад. Отметим, что по сравнению с ячменем здесь «реабилитация» эффективнее, так как происходит полное восстановление скорости ацидофикации.

Так же, как и в случае с ячменем, время ингибирования убывает по мере роста концентрации металла. Соответствующие зависимости приведены на рисунке 3 Б, где показаны концентрационные кривые не только для величины эффекта ингибирования, но и длительности задержки, а также времени достижения половинного ингибирования. Характер зависимостей подобен таковым для ячменя. Настолько же узок концентрационный диапазон эффектов, практически совпадают положения кривых на оси концентраций. Отметим, что здесь четко проявляется указанная выше «задержка» в развитии эффекта; ее концентрационная зависимость аналогична зависимости для времени ингибирования. В целом картина ингибирования ацидофицирующей активности корней пшеницы свинцом обнаруживает те же, что и для ячменя, два эффекта – более чувствительный к концентрации металла медленный и немного менее чувствительный – быстрый. Результирующее ингибирование ацидофицирующей активности корней проростков ячменя и пшеницы свинцом необратимо: подкисление раствора не наблюдали после удаления свинца из среды в течении суток и более.

Совершенно другая картина наблюдается в ходе воздействия свинца на корни представителя бобовых – проростков фасоли. Результаты, приведенные на рисунке 4, А и Б, показывают, что добавление в раствор свинца также, как и для злаковых, подавляет выделение протонов корнями. Однако здесь не наблюдается зависимость времени подавления от концентрации металла: во всех случаях время развития эффекта не превышало одного часа – предельного времени разрешения использованной методики. Концентрация свинца, при которой начинается ингибирование, здесь выше – эффект становится заметным при концентрации 10^{-9} моль/л металла. Существенно шире концентрационный диапазон – здесь он простирается от 7×10^{-10} до 10^{-8} моль/л, то есть крутизна дозной зависимости значительно меньше, чем для злаковых. Несколько выше значение концентрации половинного ингибирования – ее величина составляет 3×10^{-9} моль/л. Следует отметить обратимость эффекта – как можно видеть по данным, представленным на рисунке 4 А, ацидофикация полностью и быстро восстанавливается как после частичного подавления при времени действия металла порядка 2-5 часов, так и после полного при максимальной (из испытанных) концентраций. Можно отметить нечто подобное указанной выше «реабилитации», которая наблюдалась при минимальной концентрации металла (10^{-9}

моль/л) и исчезала по мере ее роста. Таким образом, можно констатировать отсутствие у фасоли «медленного» эффекта. Наблюдаемое ингибирование во-видимому, имеет мембранный характер, что видно по небольшому времени развития эффекта и отсутствию задержки.

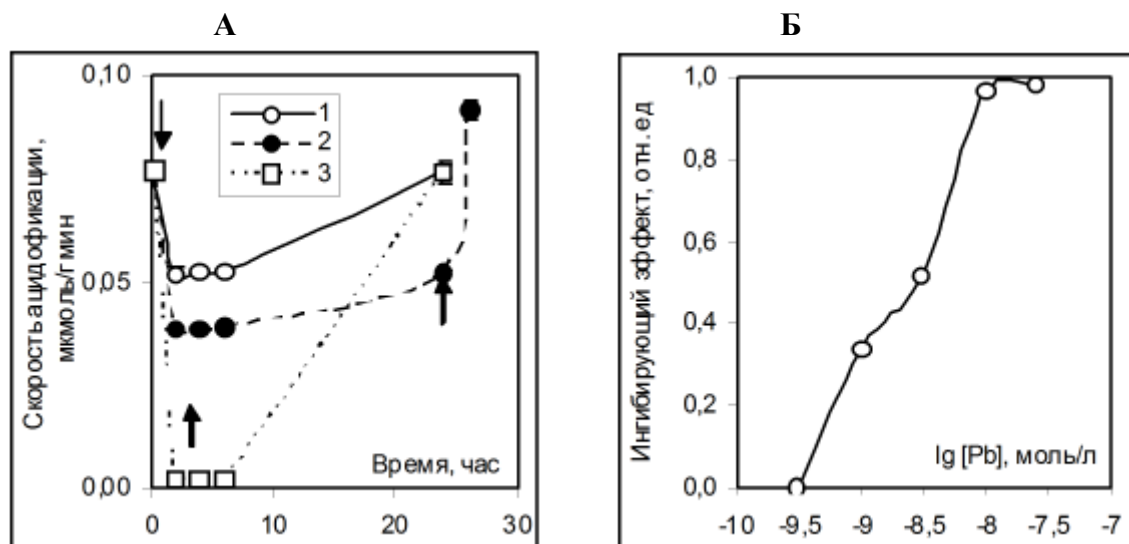


Рисунок 4 – Действие свинца на ацидофицирующую активность корней проростков фасоли:

А – Временной ход эффекта ингибирования при различных концентрациях металла, 1, 2 и 3 – соответственно (моль/л): 10^{-9} , 3×10^{-9} и 10^{-8} . Стрелка, обращенная вверх, обозначает момент добавления металла к раствору. Стрелки направленные вверх, обозначают момент устранения свинца из среды, отмыв

Б – Концентрационная зависимость стационарной величины подавления ацидофицирующей активности

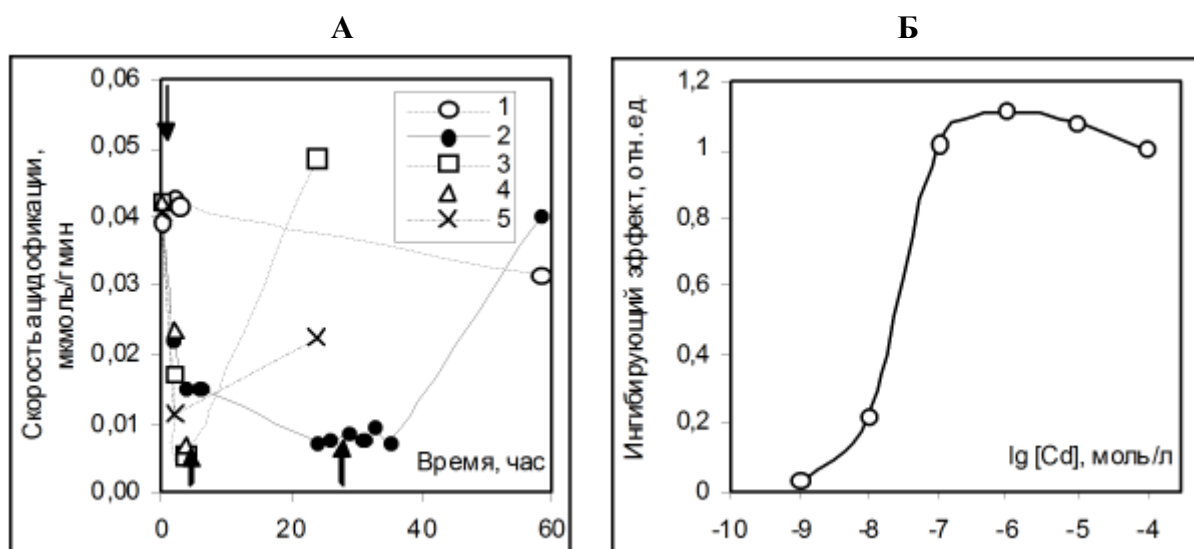


Рисунок 5 – Действие кадмия на ацидофицирующую активность корней проростков ячменя:

А – Временной ход эффекта ингибирования при различных концентрациях металла. Зависимости 1-5 получены соответственно при следующих концентрациях металла (моль/л): 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} и 10^{-4} . Стрелка, обращенная вверх, обозначает момент добавления металла к раствору. Стрелки направленные вверх, обозначают момент устранения кадмия из среды, отмыв

Б – Концентрационная зависимость стационарной величины подавления ацидофицирующей активности

Далее представлены результаты подобных экспериментов по действию другого металла-загрязнителя – кадмия – на ацидофицирующую активность корней представителей злаковых и бобовых – ячменя и фасоли. Из зависимостей, представленных на рисунке 5 А, кривые 1 и 2, видно, что для ячменя ингибирование ацидофикации при сравнительно низких концентрациях металла происходит медленно: эффект развивается за время порядка десятков часов. По мере возрастания концентрации, как показывают данные на рисунке 5 А, кривые 3-5, появляется и становится доминирующей быстрая компонента процесса ингибирования. Отметим, что после удаления кадмия из среды, как видно из рисунка 5 А, кривые 2 и 3, скорость ацидофикации после полного подавления восстанавливается практически до первоначального значения. При наличии медленной фазы процесса ингибирования после длительного, до суток, воздействия металла, как показывает зависимость 2 на рисунке 5 А, восстановление ацидофицирующей активности начинается после некоторой задержки длительностью 5 – 10 часов. Однако из того же рисунка, кривая 3, видно, что при более высокой концентрации металла, когда полное подавление ацидофикации происходило в течении 1 – 3 часов, восстановление первоначальной скорости подкисления в ходе отмыва начиналось без задержки. Зависимость доза-эффект, представленная на рисунке 5 Б, имеет S-образный характер. Концентрационный диапазон эффекта составляет 7×10^{-9} – 10^{-7} моль/л кадмия, точка половинного ингибирования равна 2×10^{-8} моль/л.

Далее, на рисунке 6 а и Б, представлены результаты аналогичных экспериментов с корнями проростков фасоли. В отличие от ячменя, как видно из кривых на рисунке 6 А, для

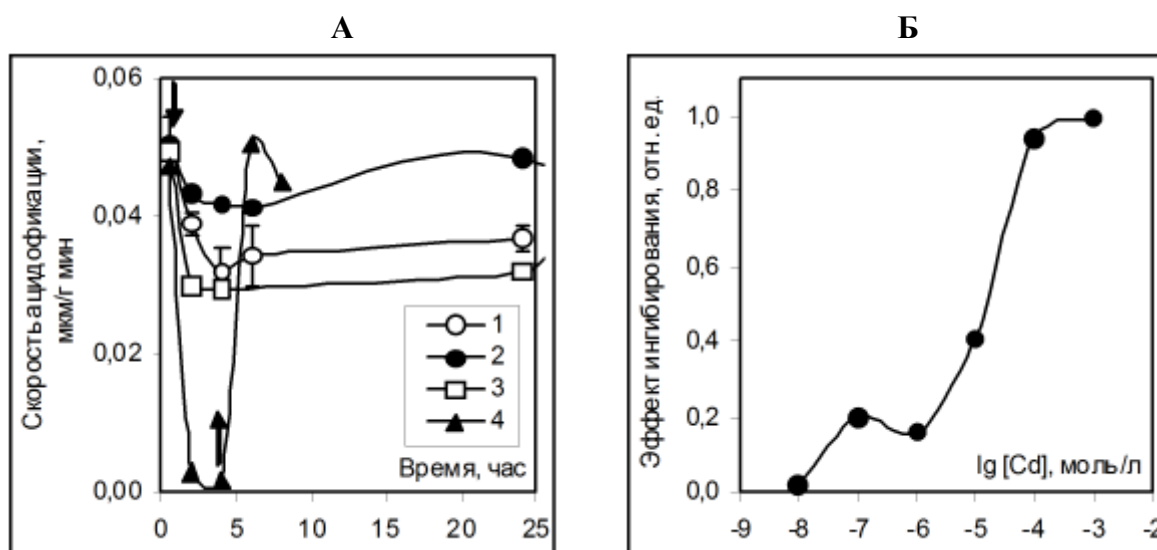


Рисунок 6 – Действие кадмия на ацидофицирующую активность корней проростков фасоли:

А – Временной ход эффекта ингибирования при различных концентрациях металла. Зависимости 1-5 получены соответственно при следующих концентрациях металла (моль/л): 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} и 10^{-4} . Стрелка, обращенная вверх, обозначает момент добавления металла к раствору. Стрелки направленные вверх, обозначают момент устранения кадмия из среды, отмыв

Б – Концентрационная зависимость стационарной величины подавления ацидофицирующей активности

фасоли медленная фаза ингибирования не наблюдается при длительности воздействия кадмия до 25 часов и более. Здесь эффект ингибирования ацидофикации развивается быстро, в пределах 4 – 5 часов, причем время половинного ингибирования с ростом концентрации металла убывает от 2-3 до 1 часа. После полного подавления ацидофикации при действии максимальной из испытанных концентраций – 10^{-4} моль/л кадмия – наблюдали быстрое (1-2 часа) и полное восстановление первоначальной интенсивности выделения протонов корнями. Концентрационная зависимость эффекта, представленная на рисунке 6 Б, показывает сравнительно широкий концентрационный диапазон – от 10^{-7} до 10^{-4} моль/л кадмия; концентрация половинного эффекта равна $1,6 \times 10^{-5}$ моль/л.

Сравнивая действие кадмия на ацидофицирующую активность ячменя и фасоли, можно отметить отсутствие медленной фазы ингибирования у фасоли и совпадение концентрации начала быстрого эффекта – порядка 10^{-7} моль/л. Очевидна также существенно меньшая крутизна концентрационной зависимости для фасоли. В целом можно констатировать существенно более низкую, чем для ячменя, чувствительность корней фасоли к кадмию.

Обсуждение результатов

Представленные выше результаты экспериментов по действию свинца и кадмия на ацидофицирующую активность корней проростков разных сельскохозяйственных культур показывают, что во всех случаях имеет место ингибирование процесса ацидофикации. Однако временной ход ингибирования и его концентрационные изменения для разных культур существенно различаются, что является проявлением их индивидуальной чувствительности и толерантности. На рисунке 7 А и Б показаны соответствующие зависимости времени половинного ингибирования ацидофикации от концентрации металлов для всех испытанных культур. Из данных рисунка 7 А видно хорошее совпадение зависимо-

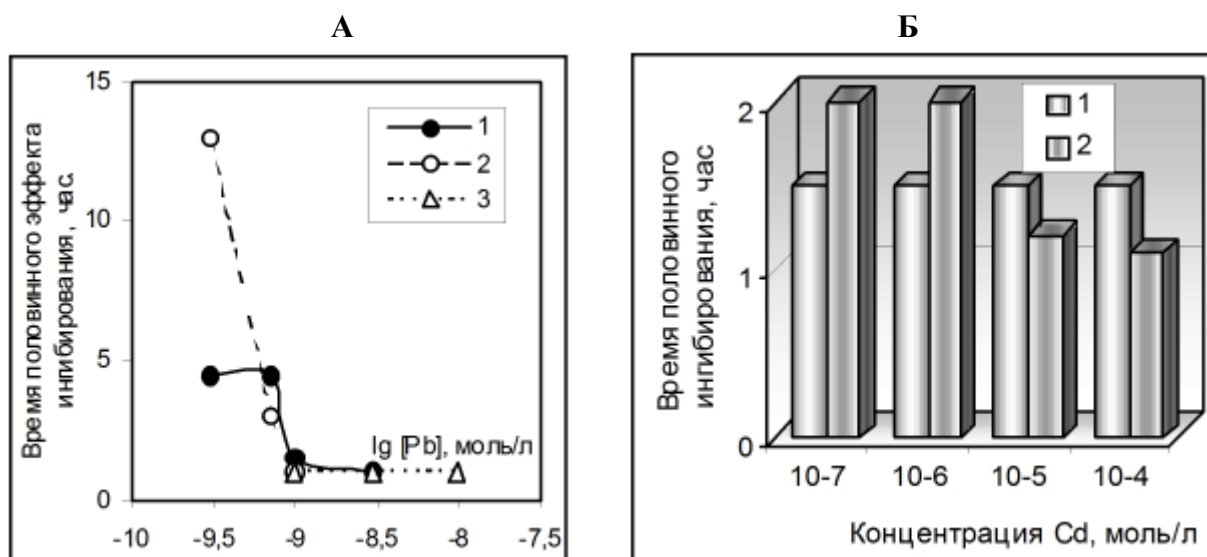


Рисунок 7– Временные характеристики действия свинца и кадмия на ацидофицирующую активность корней проростков различных культур:

А – Зависимость времени половинного эффекта ингибирования от концентрации свинца. Зависимости 1 - 3 получены соответственно для ацидофицирующей активности корней проростков ячменя, пшеницы и фасоли

Б – Аналогичная концентрационная зависимость для воздействия кадмия на корни проростков ячменя (1) и фасоли (2)

стей по свинцу для зерновых – ячменя и пшеницы: для обеих культур ингибирование сильно ускоряется с ростом концентрации металла. Концентрации свинца, при которых время половинного ингибирования уменьшается вдвое, приведены в таблице. Видно, что они достаточно близки между собой. В случае фасоли, как видно из рисунка 7, кривая 3, время ингибирования практически не зависит от концентрации металла и совпадает с минимальным значением для ячменя и пшеницы.

Подобные данные по действию кадмия на корни ячменя и фасоли приведены на рисунке 7 Б. В этом случае скорость ингибирования значительно выше и максимальное значение времени достижения половинного эффекта не превышает двух часов. Здесь видна сравнительно слабая концентрационная зависимость этого параметра: в противоположность свинцу она зарегистрирована только для фасоли.

Выше отмечалось, что для зерновых при действии обоих металлов можно констатировать наличие двух временных фаз процесса ингибирования – быстрой и медленной. Особенно четко эти фазы различаются в опытах со свинцом на зерновых. Причем медленная фаза, длительностью порядка десятков часов, начиналась после некоторой задержки, величина которой убывала от 6 часов до нуля с ростом концентрации свинца. Тогда же исчезала и медленная фаза, и ингибирование значительно ускорялось. Именно этот переход от медленной фазы к быстрой отражают концентрационные зависимости, представленные на рисунке 7 А. Еще одна особенность временного хода ингибирования выделения ионов водорода корнями проростков при действии свинца состоит в том, что при средних значениях концентрации металла, когда быстрая фаза ингибирования уже проявляется, но еще не преобладает, вслед за подавлением ацидофикации наблюдается ее быстрое самопроизвольное восстановление, своего рода «реабилитация». При дальнейшем наблюдении эта восстановленная активность вновь подавляется в ходе медленной фазы ингибирования.

Таким образом, можно предположить наличие в клетках корней двух различных процессов, вызываемых наличием свинца в среде и приводящих к подавлению ацидофицирующей активности. Эти процессы существенно различаются по характеру, временным и концентрационным параметрам. Более медленный из них начинается при более низких концентрациях металла и после некоторой задержки. Уменьшение ее продолжительности по мере роста концентрации в среде может означать, что этот медленный процесс обусловлен проникновением металла внутрь клетки и накоплением его там до необходимой концентрации. Очевидно, что в этом случае подавление ацидофицирующей активности связано с нарушениями внутриклеточного метаболизма и происходит необратимо.

Более быстрый процесс развивается в течении часа - двух и сопровождается «реабилитацией». Вполне возможно, что в этом случае ацидофицирующая активность клеток подавляется в результате прямого взаимодействия металла со структурами плазматической мембраны, в которой расположены и функционируют молекулярные комплексы протонных H^+ -АТФазных насосов, выкачивающих ионы водорода из цитоплазмы клеток в окружающую среду.

Что касается кадмия, здесь ситуация иная. Медленная фаза, небольшая по величине, выявлена только для зерновых (ячмень), но не для бобовых (фасоль). В последнем случае, как видно из рисунка 7 Б, наблюдали небольшое ускорение подавления ацидофикации с ростом концентрации кадмия в среде. Здесь, как показывают данные таблицы, зарегистрирован самый широкий концентрационный диапазон – от 10^{-7} до 10^{-4} моль/л кадмия и наиболее низкая чувствительность к металлу. Концентрация половинного ингибирования в этом случае составляла $1,6 \times 10^{-5}$ моль/л кадмия.

Сопоставление культур по параметрам, приведенным в таблице, показывает, что в случае свинца различия между зерновыми практически отсутствуют. Для бобовых (фасоль) можно отметить значительно более широкий концентрационный диапазон эффекта ингибирования и более чем на порядок меньшую чувствительность к металлу. Для кадмия ситуация подобна, но количественные различия между культурами более существенны. Бобовые (фасоль) почти на три порядка менее чувствительны к металлу, и концентрационный диапазон эффекта ингибирования простирается от 10^{-7} до 10^{-4} моль/л кадмия в среде. Свинец оказался существенно более токсичным как для зерновых, так и для бобовых, при этом различия в чувствительности к кадмию между культурами существенно выше, чем в случае свинца. Возможно, что более высокая устойчивость фасоли к испытанным металлам связана с отсутствием для нее более чувствительной медленной фазы подавления ацидофицирующей активности, которая, по-видимому, связана с накоплением металла внутри клетки. Это означает, что либо металлы хуже проникают через плазматическую мембрану клеток корня фасоли и накапливаются в клетке в меньшей степени, либо проникают, но не вызывают в цито плазме соответствующих реакций. С этим

Таблица – Концентрационные параметры величины эффекта ингибирования ацидофицирующей активности и времени его развития для разных культур

		Ячмень	Пшеница	Фасоль
Свинец	Концентрация половинного ингибирования, моль/л	5×10^{-10}	5×10^{-10}	3×10^{-9}
	Концентрация, при которой время половинного ингибирования уменьшается вдвое, моль/л	$5,5 \times 10^{-10}$	2×10^{-10}	-
	Концентрационный диапазон эффекта ингибирования, моль/л	3×10^{-10} - 7×10^{-10}	3×10^{-10} - 7×10^{-10}	5×10^{-10} - 10^{-8}
Кадмий	Концентрация половинного ингибирования, моль/л	2×10^{-8}	-	$1,6 \times 10^{-5}$
	Концентрационный диапазон эффекта ингибирования, моль/л	10^{-8} - 10^{-7}	-	10^{-7} - 10^{-4}

же связана обратимость подавления ацидофикации свинцом для фасоли по сравнению с зерновыми. По-видимому, у фасоли испытанные тяжелые металлы подавляют H^{+} -АТФазную помпу, взаимодействуя напрямую с цитоплазматической мембраной клеток корня. В то же время H^{+} -АТФазная помпа корней фасоли, в отличие от злаковых, не проявляет заметной чувствительности к тяжелым металлам, действующим изнутри, с цитоплазматической стороны мембраны. Подобные различия в свойствах H^{+} -помпы растений разных видов могут быть результатом мультигенности семейства генов, кодирующих этот фермент, и, соответственно, наличия различных его изоформ в растениях разных видов [2, 3].

Литература

1. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. - М.: Наука, 1968. -266 с.
2. Portillo F. Regulation of planta membrane H^{+} -ATPase in fungi and plants. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, V. 1469. P. 31-42.

3. Arango M, Geavudant F, Oufattole M, Boutry M. The plasma membrane proton ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta*, 2003, V. 216. P. 355-365.

**SPECIFIC FEATURES OF HEAVY METALS INFLUENCE
ON ACIDIFICATION ACTIVITY OF PLANT ROOTS**

A.I. Sokolik, N.V. Kabanova, J.A. Soroka, V. M. Yurin

Belarusian State University, Minsk, Belarus

Effects of cadmium and lead chlorides on protons excretion rate of seedling roots of barley, wheat and a string bean were under studying. It was shown, that lead and cadmium depending on concentration in different degree and with various time parameters diminish acidification activity of roots of the tested cultures.

Cadmium practically equally influence on representatives of both kinds of plants – barley (cereals) and a string bean (bean): the full and reversible inhibition of acidification activity of roots in rather low concentration $10^{-8} - 10^{-7}$ mol/l was observed. For lead essential differences revealed are a full irreversibility of inhibition for barley and wheat and reversibility for a string bean. Lead appeared to be more toxic for both kinds of plants: the inhibition of acidification activity of cereals begins already at concentration of metal 3×10^{-10} mol/l, at the same time the string bean is more tolerant against action both pollutants.