

2. Заварзин Г.А. Три жизни великого микробиолога. Документальная повесть о Сергее Николаевиче Виноградском / под. ред. и с коммент. Н.Н. Колотиловой. – М.: ЛИБРОКОМ, 2009. – 240 с.
3. Заварзин Г.А. Эволюция прокариотной биосферы: микробы в круговороте жизни. 120 лет спустя: чтение им. С.Н. Виноградского / ред. Колотилова Н.Н. – М.: МАКС Пресс, 2011. – 144 с.
4. Dworkin M. Sergei Winogradsky: a founder of modern microbiology and the first microbial ecologist // FEMS Microbiology Rev. – 2012. – V. 36. – P. 364-379.
5. Winogradsky S.N. Microbiologie du sol. Problemes et methodes. Cinquante ans de recherches. – Paris: Masson et Cie, 1949. – 768 p.

УДК 581.5:577.15

Кузнецова В.А., Иваченко Л.Е.

Благовещенский государственный педагогический университет

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ КУЛЬТУРНОЙ И ДИКОРАСТУЩЕЙ СОИ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ВЕГЕТАЦИИ

V. Kuznetsova, L. Ivachenko

Blagoveshchensk State Pedagogical University

INFLUENCE OF SALTS OF HEAVY METALS ON PEROXIDASE ACTIVITY OF GLYCINE MAX AND GLYCINE SOJA AT DIFFERENT STAGES OF VEGETATION

Аннотация. Исследовано действие сульфатов меди, цинка, кадмия и свинца на активность и множественные формы пероксидаз культурной и дикорастущей сои на стадии первого тройчатого листа и в период цветения. Выявлены изменения активности фермента на различных стадиях вегетации. Наибольшее количество множественных форм пероксидаз выявлено в фазу цветения для культурной сои. Пероксидазную активность можно, в перспективе, использовать как биохимический тест на устойчивость сои к воздействию тяжелых металлов.

Ключевые слова: тяжелые металлы, пероксидаза, активность, множественные формы, соя.

Abstract. The effect of sulfates of copper, zinc, cadmium and lead on the activity and multiple forms of peroxidase of cultivated and wild soybean in the first trifoliolate leaf stage and the flowering period is investigated. An inverse relationship of the activity of the enzyme at various stages of vegetation is established. The increased quantity of multiple forms of peroxidase is revealed in the flowering phase for cultivated soybean. The peroxidase activity can be used as a biochemical test for resistance of soybean to the influence of heavy metals.

Key words: heavy metals, peroxidase, activity, multiple forms, soybean.

Одной из важнейших проблем в экологии растений является изучение ответной реакции растений на действие солей тяжелых металлов (ТМ), которые при повышенных концентрациях являются токсикантами. Данная проблема имеет не только практическое значение, связанное с возрастающим загрязнением окружающей среды ТМ, но и с исследованием механизмов адаптации растений. Среди тяжелых металлов наиболее распространенными токсикантами являются кадмий и свинец, тогда как медь и цинк относятся к биогенным элементам. Поступая в клетки, ТМ приводят к нарушениям метаболизма, вызывая окислительный стресс,

что лежит в основе высокой токсичности ТМ [6]. Поэтому в наших исследованиях были выбраны широкораспространенные ТМ: кадмий, свинец, медь и цинк.

Одним из методов тестирования состояния окружающей среды является метод биохимического тестирования. К биохимическим тест-системам, пригодным для оценки токсического воздействия разнообразных соединений относятся, прежде всего, ферменты, как универсальные катализаторы и регуляторы обменных процессов в живой природе [2]. Разнообразие токсических веществ и широкий круг ферментов, способных участвовать в их детоксикации, затрудняет поиск ферментов-индикаторов. Обнаружение «универсальных» тест-ферментов крайне важно для быстрого и доступного определения состояния окружающей среды и процессов, происходящих в живых системах. Среди факторов, определяющих выбор тест-ферментов, первостепенное значение имеют широта их распространения и достаточно высокий уровень активности у организмов, доступность и надежность определения их каталитической активности и высокая чувствительность к разнообразным токсическим воздействиям [7]. По изменению ферментативной активности при влиянии различных факторов пероксидаза является перспективным тест-ферментом [5]. Пероксидазную активность можно использовать для изучения биохимической адаптации сои к экстремальным воздействиям факторов среды [2].

Амурская область является основным регионом возделывания сои в России. Расширение посевных площадей этой ценной культуры неизбежно приведет к размещению ее на почвах, загрязненных ТМ. В связи с этим актуальными являются исследования, которые позволят оценить влияние загрязнения почвы ТМ на развитие сои, ее адаптацию к измененным условиям выращивания. В связи с вышеизложенным, мы поставили перед собой цель изучить влияние солей тяжелых металлов на активность и множественные формы пероксидаз дикорастущей и культурной сои. Материалом для исследований служила

культурная (*Glycine max (L.) Merr.*) (сорт Соната) и дикорастущая соя (*Glycine soja Sieb. et Zucc.*), семена которых были получены из ГНУ ВНИИ сои РАСХН (г. Благовещенск). На первом этапе исследования сою проращивали в тепличных условиях на почве с полей с. Садового Тамбовского района с внесением сульфатов тяжелых металлов (меди, цинка, кадмия и свинца). В почву вносили сульфаты каждого металла отдельно в концентрациях, в два раза превышающих ОДК и в десять раз превышающих содержание металла на 1 кг почвы. Опыт длился 17 дней (до появления первого тройчатого листа) и 41 день (до периода цветения). Контролем служили образцы сои, выращенные на почве без внесения тяжелых металлов.

Для приготовления экстрактов растворимых белков навеску исследуемого материала (500 мг) гомогенизировали в фарфоровых ступках в течение 15 мин на холоду с ацетатным буфером (рН 4,7). Полученный экстракт центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость фильтровали через мельничный газ и использовали для определения активности пероксидаз сои фотоэлектроколориметрическим методом по Бояркину в модификации Мокроносова [4]. Белок определяли методом Лоури. Электрофоретические спектры пероксидаз выявляли методом электрофореза на колонках 7,5%-го полиакриламидного геля с последующим окрашиванием зон [3]. Поскольку стандартным критерием для характеристики множественных форм ферментов является их относительная электрофоретическая подвижность (R_f), влияние тяжелых металлов на множественные формы пероксидаз сои оценивали по выявленным формам согласно их R_f [1].

В результате проведенных исследований установлено, что удельная активность пероксидаз в контрольных образцах культурной и дикорастущей сои на изученных стадиях вегетации подвержена определенным изменениям (рис. 1, 2). При проращивании сои сорта Соната с внесением в почву сульфатов цинка, меди и свинца в исследуемых концентрациях

активность пероксидаз увеличивается незначительно по сравнению с контролем на этапе формирования первого тройчатого листа и значительно возрастает в период цветения (рис. 1). Следует отметить, что сульфат кадмия вызывает незначительное повышение активности пероксидаз в период формирования тройчатого листа и в период цветения при концентрации этой соли 2 ОДК.

При проращивании дикорастущей сои с внесением в почву солей сульфата цинка и кадмия в исследуемых концентрациях активность пероксидаз увеличивается незначительно по сравнению с контролем (рис. 2) на этапе формирования первого тройчатого листа и в период цветения, за исключением образцов, выращенных на почве с содержанием сульфата цинка в концентрации 46 мг/

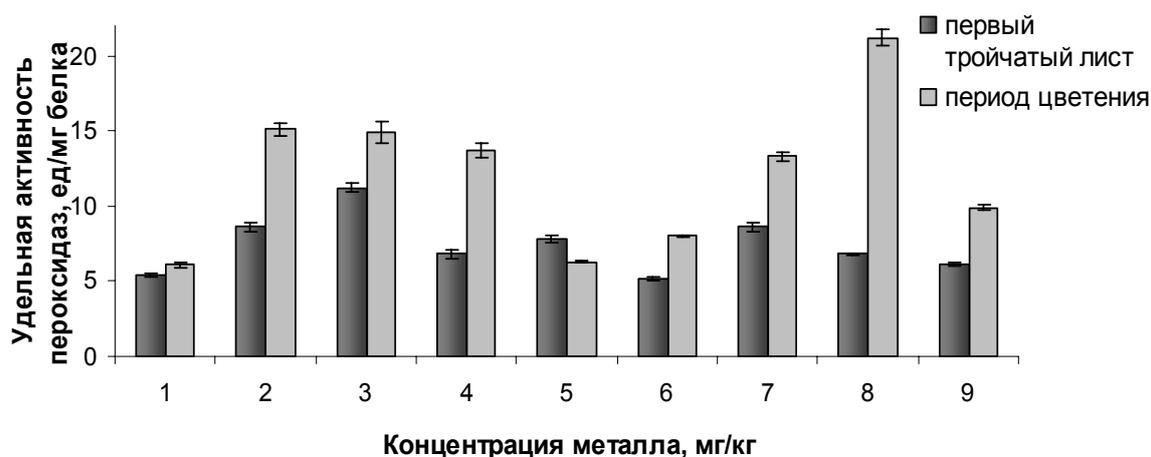


Рис. 1. Влияние солей тяжелых металлов на удельную активность пероксидаз культурной сои на разных стадиях вегетации (1 – контроль, 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 4 – $CdSO_4$ (0,2 мг/кг), 5 – $CdSO_4$ (2 ОДК), 6 – $CuSO_4$ (1,6 мг/кг), 7 – $CuSO_4$ (2 ОДК), 8 – $PbSO_4$ (2,75 мг/кг), 9 – $PbSO_4$ (2 ОДК))

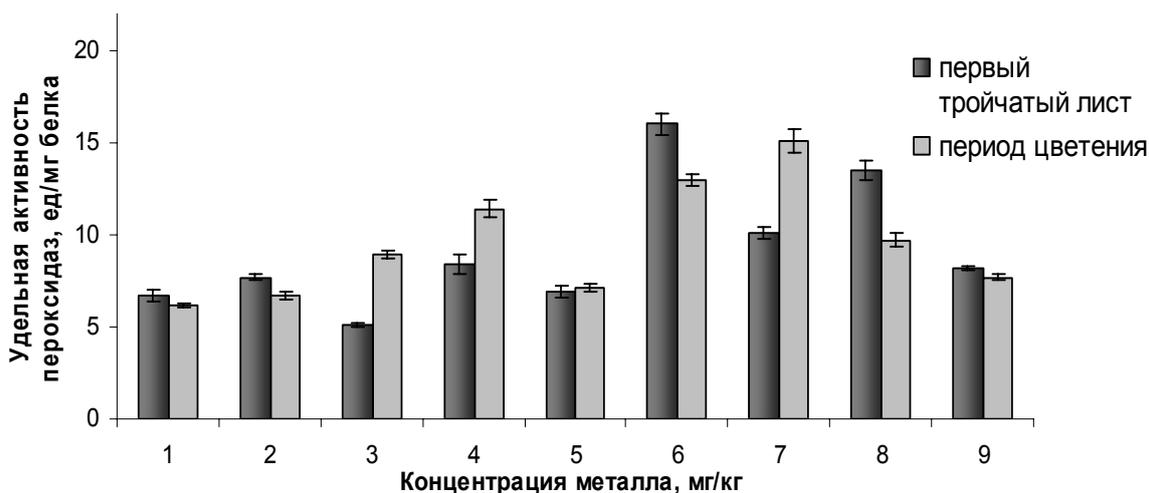


Рис. 2. Влияние солей тяжелых металлов на удельную активность пероксидаз дикорастущей сои на разных стадиях вегетации (1 – контроль, 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 4 – $CdSO_4$ (0,2 мг/кг), 5 – $CdSO_4$ (2 ОДК), 6 – $CuSO_4$ (1,6 мг/кг), 7 – $CuSO_4$ (2 ОДК), 8 – $PbSO_4$ (2,75 мг/кг), 9 – $PbSO_4$ (2 ОДК))

кг на стадии первого тройчатого листа, где активность фермента была минимальна. При внесении сульфата меди различной концентрации активность пероксидаз значительно возрастает по сравнению с контролем на всех этапах вегетации. Соли свинца в концентрации 2,75 мг/кг увеличивают активность пероксидаз по сравнению с контролем в период формирования тройчатого листа и в период цветения, а использование этой соли в концентрации 12 мг/кг приводит к незначительному повышению пероксидазной активности по сравнению с контролем.

Сравнивая энзимогаммы пероксидаз в период формирования первого тройчатого листа и в период цветения, следует отметить увеличение количества форм фермента в период цветения (рис. 3, 4).

В контроле у дикорастущей сои выявлено по четыре стабильные формы, а для культурной сои в фазе цветения установлено пять форм пероксидаз. Высокой встречаемостью выделились формы с невысокой электрофоретической подвижностью (П18, П17, П13 и П9).

При внесении солей тяжелых металлов появляются формы с высокой и средней электрофоретической подвижностью, особенно у дикорастущей сои. У культурной сои в период формирования первого тройчатого листа выявлено угнетение форм пероксидазы при внесении солей кадмия высокой концентрации (2 ОДК) и свинца. В период цветения в листьях культурной сои, выращенной с добавлением соли цинка и свинца (2 ОДК), установлено максимальное количество форм (– шесть форм). В листьях дикорастущей сои в этих образцах обнаружено минимальное количество форм.

Таким образом, установлено, что внесение исследуемых солей ТМ в почву вызывает увеличение пероксидазной активности в фазе цветения культурной сои, за исключением сульфата кадмия в высокой и сульфата меди в минимальной концентрациях. Соли ТМ в большинстве вариантов повышают пероксидазную активность дикорастущей сои на стадии формирования первого тройчатого листа. Выявлена интересная закономерность как для культурной, так и для дикорастущей

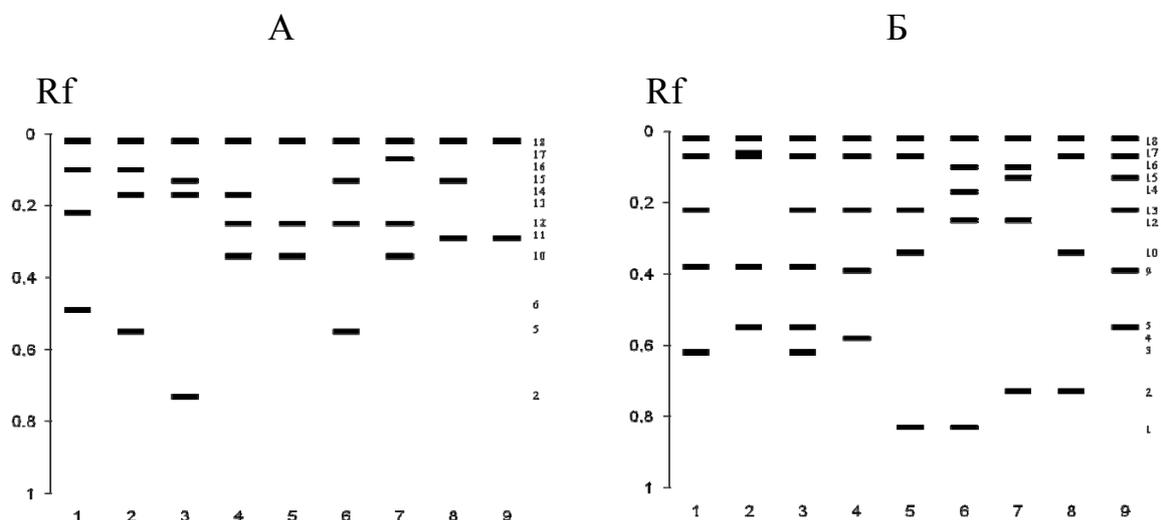


Рис. 3. Схемы энзимогамм пероксидаз культурной сои в период формирования первого тройчатого листа (А) и в период цветения (Б), выращенной в почве с внесением солей тяжелых металлов (1 – контроль, 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 4 – $CdSO_4$ (0,2 мг/кг), 5 – $CdSO_4$ (2 ОДК), 6 – $CuSO_4$ (II) (1,6 мг/кг), 7 – $CuSO_4$ (II) (2 ОДК), 8 – $PbSO_4$ (2,75 мг/кг), 9 – $PbSO_4$ (2 ОДК)); П1–П18 – формы пероксидаз

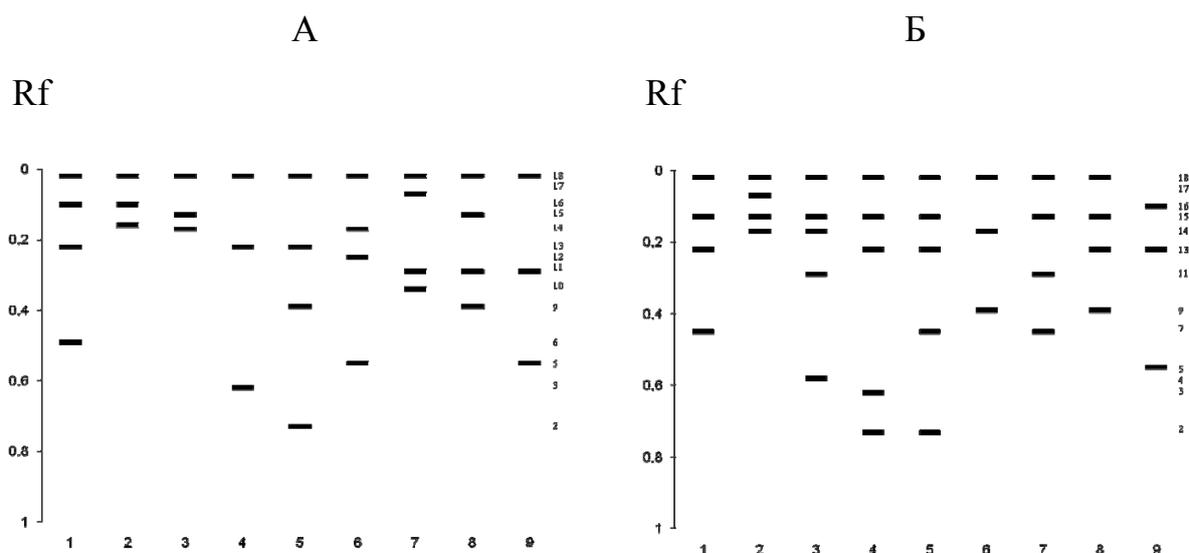


Рис. 4. Схемы энзимограмм пероксидаз дикорастущей сои в период формирования первого тройчатого листа (А) и в период цветения (Б), выращенной в почве с внесением солей тяжелых металлов (1 – контроль, 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 4 – $CdSO_4$ (0,2 мг/кг), 5 – $CdSO_4$ (2 ОДК), 6 – $CuSO_4$ (1,6 мг/кг), 7 – $CuSO_4$ (2 ОДК), 8 – $PbSO_4$ (2,75 мг/кг), 9 – $PbSO_4$ (2 ОДК))

сои: если в фазу первого тройчатого листа удельная активность пероксидаз повышена, то в стадии цветения она снижается, и наоборот. Соли биогенных металлов цинка и меди оказывают менее значительное влияние на удельную активность пероксидаз, чем соли наиболее токсичных металлов кадмия и свинца. Фазы развития сои различаются по количеству множественных форм пероксидаз. Наибольшее количество форм выявлено в фазу цветения у культурной сои. Peroксидазную активность в перспективе можно использовать как биохимический тест на устойчивость сои к воздействию тяжелых металлов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Иваченко Л.Е. Методы изучения полиморфизма ферментов сои. – Благовещенск: изд-во БГПУ, 2008. – 142 с.
2. Иваченко Л.Е. Ферменты как маркеры адаптации сои к условиям выращивания: монография. – Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2011. – 192 с.
3. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. – Новосибирск: Наука, 1986. – 145 с.
4. Малый практикум по физиологии растений /под ред. А.Т. Макроносова. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 184 с.
5. Рогожин В.В. Peroксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
6. Степанок В.Б. Влияние сочетания соединений тяжелых металлов на урожай сельскохозяйственных культур и поступление тяжелых металлов в растениях // Агрoхимия. – 2000. – № 1. – С. 74-80.
7. Хочачко П. Биохимическая адаптация / П. Хочачко, Дж. Сомеро. – М.: Мир, 1988. – 568 с.