

12. Влияние нефтепродуктов на биологическую активность почв / Ф.Г. Хазиев [и др.] // Биологические науки. – 1988а. – № 10. – С. 93–99.
13. Штина Э.А. Почвенные водоросли как экологические индикаторы // Ботан. журн. – 1990. – №4. – Т.75. – С. 441–452.
14. Штина Э.А., Зенова Г.Н., Манучарова Н.А. Альгологический мониторинг почв // Почвоведение. – 1998. – № 12. – С. 1449–1461.



УДК 634.94: 581.1

И.А. Чаплыгина, Н.В. Фомина

### ГИСТОБИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОРОСТКОВ *CUCUMIS SATIVUS* L., ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА ПОЧВОГРУНТЕ, ЗАГРЯЗНЕННОМ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

*В статье представлены результаты комплексного гистобиохимического исследования проростков *Cucumis sativus* L., полученных при выращивании на загрязненном медью и кадмием почвогрунте. Гистохимический метод позволяет выявить механизм распределения тяжелых металлов в тканях проростков и оценить степень их поражения при явном внешнем благополучии. Биохимические показатели, такие как: активность каталазы, содержание хлорофилла и сахарозы значительно снижаются за счет ингибирования метаболических процессов, происходящих в тканях проростков.*

**Ключевые слова:** *тяжелые металлы, проростки, гистологический анализ, каталаза, хлорофилл, протеин.*

I.A. Chaplygina, N.V. Fomina

### HISTOLOGIC BIOCHEMICAL ANALYSIS OF *CUCUMIS SATIVUS* L. SEEDLINGS OBTAINED WHEN GROWN ON HEAVY METAL CONTAMINATED SOIL

*The results of the complex histologic biochemical research of *Cucumis sativus* L. seedlings, obtained when grown on copper and cadmium contaminated soils. Histochemical method allows to reveal the mechanism of heavy metal distribution in seedling tissues and to assess their damage degree, even in the apparent external wellbeing. Biochemical indices such as catalase activity, chlorophyll and sucrose content, decrease significantly due to metabolic process inhibition in the seedling tissues.*

**Key words:** *heavy metals, seedlings, histologic analysis, catalase, chlorophyll, protein.*

**Введение.** Основной средой, в которую попадают тяжелые металлы, в том числе из атмосферы и водной среды, является почва. Она же служит источником вторичного загрязнения приземного воздуха и вод, попадающих из нее в Мировой океан. Из почвы тяжелые металлы усваиваются растениями, которые затем попадают в пищу более высокоорганизованным животным [1].

Тяжелые металлы относятся к загрязняющим веществам, наблюдения за которыми обязательны во всех средах жизни. Их доступность для организмов зависит от формы их существования: связанной или свободной [12]. Уже сейчас они занимают второе место по степени опасности, уступая пестицидам и значительно опережая такие широко известные загрязнители, как углекислый и сернистый газ, в прогнозе же они должны стать самыми опасными, более опасными, чем отходы АЭС и твердые отходы [6, 10].

Средства химизации – это основные факторы, воздействующие на агроэкосистему в сельскохозяйственных ландшафтах. В локальном масштабе существенный канал поступления тяжелых металлов – их внесение непосредственно в почву с веществами, используемыми в сельском хозяйстве в качестве удобрений: с осадками сточных вод, компостами из городского мусора, а также пестицидами, фунгицидами, с загрязненными оросительными водами, с минеральными удобрениями. Известкование также является источником загрязнения почв тяжелыми металлами, его вклад в их общее поступление довольно ощутим [5, 8]. Кроме того, большую опасность с

точки зрения загрязнения среды тяжелыми металлами представляет использование в сельском хозяйстве компостов из городского мусора, бытовых и промышленных осадков сточных вод [13].

Достаточно значительную роль в поступлении токсикантов в растительную продукцию играют протекторные функции почвы. Накопление поллютантов в растениях зависит не только от буферных способностей почв, но и от толерантности самих растений, то есть их способности переводить соединения металлов в физиологически неактивное состояние [2, 7].

Основными факторами, снижающими содержание тяжелых металлов в растениях, являются защитные механизмы, которые формируются в культурах, произрастающих в условиях нарушения химического баланса в окружающей среде. Эти механизмы вырабатываются не только в ходе онтогенеза, но и филогенеза [6].

При возрастающем техногенном потоке защитные возможности растений по отношению к тяжелым металлам уменьшаются. Корни не способны полностью перекрыть попадание избытка металлов в ксилему. При сильном загрязнении среды обитания поток загрязнителей становится столь большим, что наблюдается повышенное содержание их не только в вегетативных органах, но и в органах запасаания ассимилянтов. Растения выглядят угнетенными, появляются признаки хлороза, некроза, снижается их продуктивность. Это указывает на нарушения нормальной деятельности метаболических центров и течения метаболических процессов. При очень сильном загрязнении растения прекращают развитие и гибнут [9].

В свою очередь чувствительность растений к действию поллютантов имеет особое практическое значение. С одной стороны, необходимо выявить растения, наиболее чувствительные к загрязнению почв, для определения опасного уровня загрязнения последних, а с другой, найти наиболее устойчивые к токсикантам культуры для безопасного использования загрязненных почв [11].

В настоящее время огромное внимание уделяют изучению влияния тяжелых металлов на живые организмы. Однако комплексного исследования, включающего изучение морфологических, гистохимических и биохимических параметров растений, не представлено, поэтому исследуемая проблема на сегодняшний день является актуальной.

**Цель работы** – изучение влияния ионов тяжелых металлов на гистобиохимические параметры проростков *Cucumis sativus L.*

**В задачи работы** входило:

- определить влияние искусственного загрязнения почвогрунта тяжелыми металлами (медь, кадмий) на морфологические признаки проростков огурца;
- исследовать интенсивность и механизм распределения тяжелых металлов в тканях огурца (гистохимическая характеристика);
- изучить изменение биохимических показателей проростков огурца при внесении в почвогрунт ионов тяжелых металлов.

**Объектом исследования** являлись проростки огурца среднеспелого *Cucumis sativus L.*, сорт «Надежный». Семена соответствуют требованиям ГОСТа Российской Федерации. Для проведения исследований использовали питательный почвогрунт следующего состава: азот ( $N-NH_4$ ) – 200 мг/кг, калий ( $K_2O$ ) – 450 мг/кг, фосфор ( $P_2O_5$ ) – 450 мг/кг, кислотность (pH) 5,0 – 6,5, соблюдая рекомендуемые для них условия выращивания. Период интенсивного внесения тяжелых металлов составлял 14 дней от момента появления первых всходов.

Опыт закладывали в пяти повторностях, руководствуясь следующей схемой: 1 – без внесения солей тяжелых металлов (контроль); 2 – с внесением в почву ионов кадмия; 3 – с внесением в почву ионов меди.

Ионы меди вносили в почву в виде раствора сульфата меди из расчета 50 мг/кг почвы, что соответствует ПДК подвижных форм меди в почве. Ионы кадмия – в виде нитрата кадмия из расчета 1 мг/кг почвы в соответствии с ПДК подвижных форм в почве [3].

Для анализа морфологических и визуальных изменений проростков использовали внешний вид, окраску листьев, количество листьев и длину побега. Морфологические изменения оценивались с целью сравнения с полученными данными по гистохимическому анализу.

В ходе работы проводилось гистохимическое изучение распределения тяжелых металлов в тканях проростков огурца. Для этого готовили серию поперечных срезов стебля, черешка, корней и листьев. В качестве реагента использовали раствор дифенилтиокарбазона (дитизон). Медь и кадмий обнаруживались в тканях в виде нерастворимых дитизонатов красного цвета [14].

В качестве биохимических параметров исследовали содержание сахаров фенолсерным методом, количество сырого протеина – методом колориметрирования с реактивом Несслера, содержание хлорофилла – колориметрическим методом, активность каталазы – по Баху и Опарину [15].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Рост как процесс, отражающий общий итог всех функциональных и метаболических изменений в растениях и наиболее точно коррелирующий с ходом накопления биомассы, используют в качестве универсального индикатора при оценке физиологического состояния растений. В результате проведенных исследований установлено, что окраска листьев проростков огурцов, выращенных в условиях загрязнения почвогрунта кадмием и медью, приобретала более светлый, желто-зеленый оттенок. Формирующиеся листья по размеру значительно уступали контрольному варианту, особенно в варианте с применением меди. Однако количество листьев при использовании меди было наибольшим, чем в варианте с внесением в почвогрунт соли, содержащей кадмий (табл. 1).

Таблица 1

## Ростовые характеристики 14-дневных проростков огурца

Вариант опыта	Длина побега, мм	Количество листьев, шт.
Контроль	103,13±5,896	4,3±0,65
Кадмий	65,38±7,533	1,8±0,37
Медь	97,88±4,879	2,3±0,31

Значительная часть листьев огурцов под действием тяжелых металлов, как кадмия, так и меди, деформировалась. При этом внесение в грунт соли кадмия вызывало закручивание листьев наружу, а внесение меди закручивание внутрь. На листьях при внесении кадмия появлялись явные некротические пятна. Кроме того, установлено уменьшение длины побегов и количества листьев огурца под действием тяжелых металлов. Так, длина побегов огурцов под действием ионов кадмия снижалась на 37 %, а в результате воздействия ионов меди лишь на 5 % по сравнению с контролем. При этом наблюдалось уменьшение и количества листьев огурцов на 59 и 47 % при внесении в почвогрунт соли кадмия и меди соответственно (рис. 1). Вероятно, это связано с активным использованием меди в процессах жизнедеятельности растительного организма.

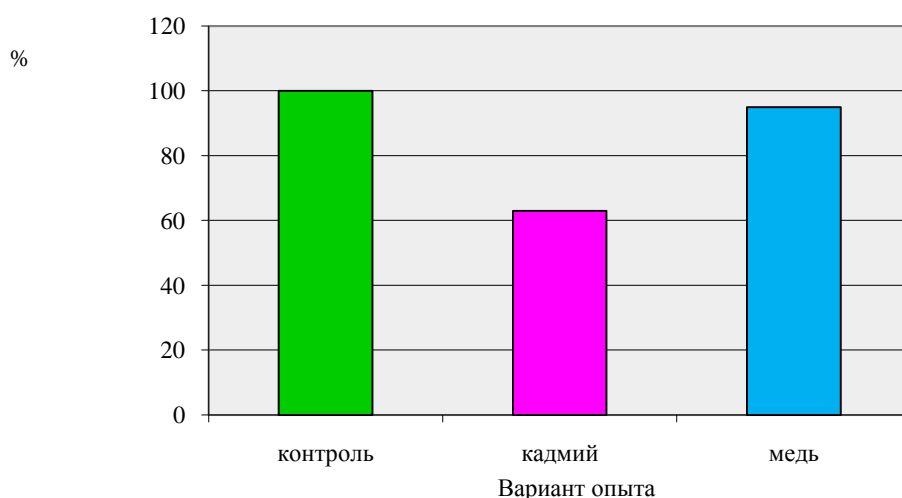


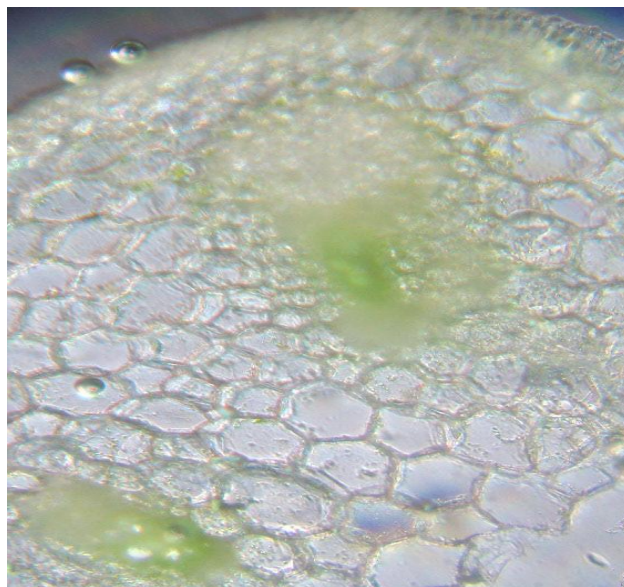
Рис. 1. Длина 14-дневных проростков огурца, % по отношению к контролю

Ингибирование роста растений происходит, с одной стороны, из-за нарушения метаболизма и, с другой стороны, в результате более прямого действия металла на рост, например, в результате взаимодействия с полисахаридами оболочек, снижения пластичности клеточных оболочек, ингибирования деления клеток [4].

По-видимому, ионы меди в меньшей степени воздействуют на рост клеток растяжением и удлинением побега, но задерживают деление клеток и образование вегетативных органов.

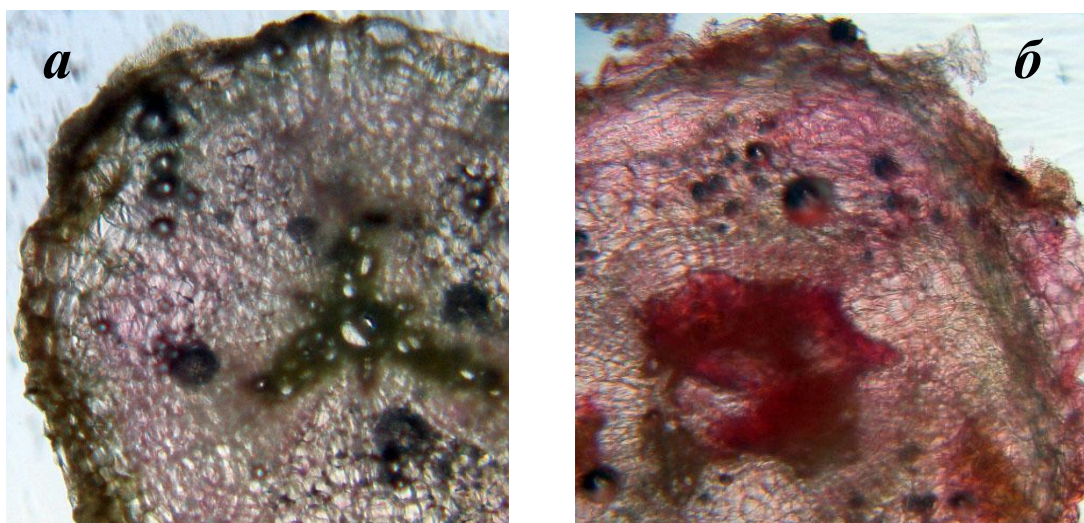
При проведении гистохимического анализа установлено, что в контрольном варианте реакция растений с дитизоном была отрицательной. На рисунке 2 не наблюдается явных окрашенных конгломератов солей тяжелых металлов. Однако при изучении проростков огурца, полученных при выращивании на загрязненном почвогрунте, определено значительное проникновение ионов кадмия и меди в ткани. Реакция с ди-

тизоном вызывала окрашивание срезов различной интенсивности. Распределение окраски срезов и ее интенсивности зависело от типа исследуемой ткани и степени проникновения ионов тяжелых металлов, а также от того, какие элементы находились в почвенной среде.



*Рис. 2. Участок стебля огурца, выращенного на грунте без внесения тяжелых металлов (контроль)*

Соли кадмия и меди были обнаружены главным образом в клеточных стенках ризодермы и коре корня. Большую концентрацию этих элементов также наблюдали в наружных слоях клеток и слизи, окружающей корень. Окрашивание после выращивания проростков на среде, содержащей ионы кадмия, было ярче, что указывало на более интенсивное его накопление в тканях. Ионы кадмия также вызвали сильное ослизнение клеток корня и потерю тургора, что свидетельствует об отравлении корней. На поперечных срезах было видно, что кадмий и медь в больших количествах откладывались преимущественно в клеточных стенках тканей корня (рис. 3).



*Рис. 3. Распределение ионов меди (а) и кадмия (б) в корнях огурца*



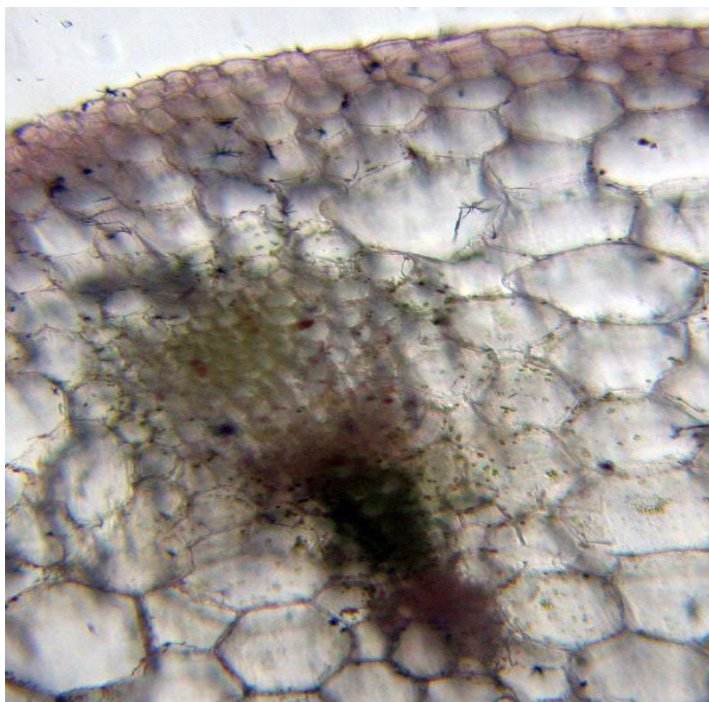


Рис. 4. Распределение ионов меди в стеблях огурца

При исследовании срезов стебля огурца ионы меди и кадмия были обнаружены в клетках эпидермы, паренхимы и колленхимы (рис. 4, 5), а также в незначительных концентрациях в проводящих тканях. В варианте с внесением меди окрашивались исключительно клеточные стенки (см. рис. 4), причем наиболее интенсивно.

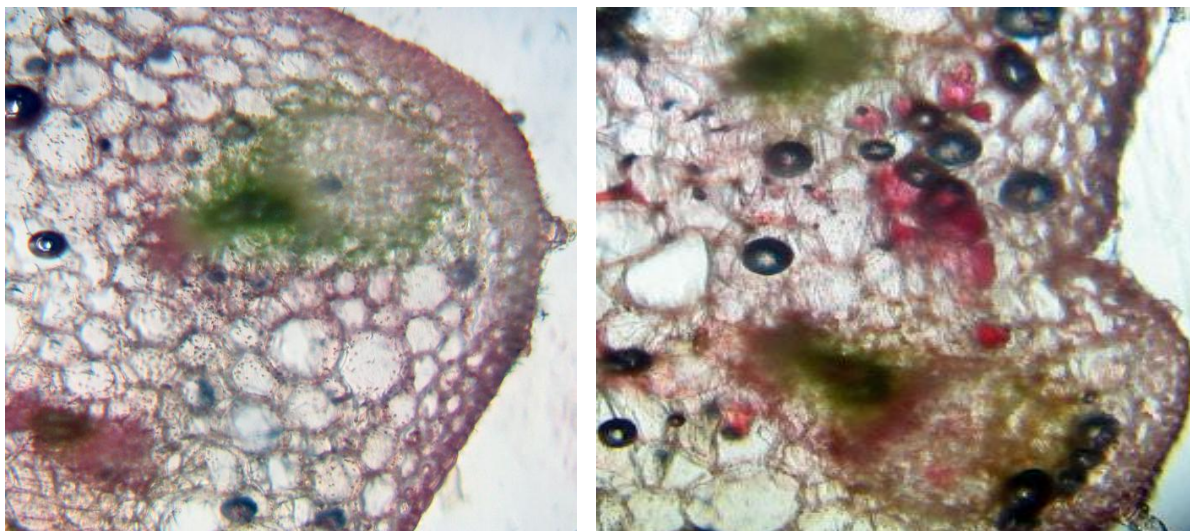


Рис. 5. Распределение ионов кадмия в стебле огурца (темные круги)

Следует отметить, что в варианте при внесении в почвогрунт соли кадмия происходило и окрашивание вакуолей клеток (см. рис. 5). Поперечные срезы листьев удалось получить только в варианте с использованием меди, так как при использовании кадмия листья оказались очень хрупкими и лишенными тургора. Однако клеточный сок, полученный из листьев, давал в итоге красное окрашивание с дитизином. При ис-

пользовании меди было отмечено красное окрашивание эпидермиса и проводящего пучка центральной жилки листа (рис. 6).

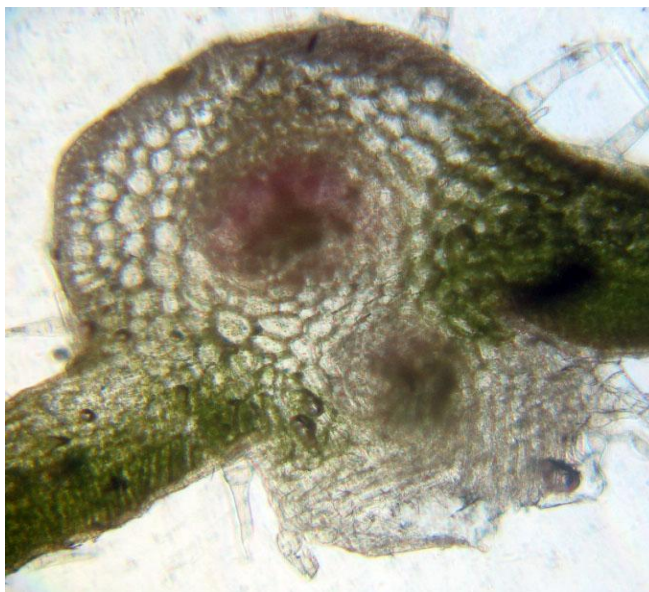


Рис. 6. Распределение ионов меди в листе огурца

Подобное негативное влияние можно объяснить накоплением ионов металлов в свободном пространстве клеточной стенки, которое определяется величиной ионообменного коэффициента. Проникая через клеточную стенку, одна часть ионов связывается с реактивными компонентами апопласта, другая поступает в цитозоль. Поступившие в цитоплазму ионы могут связываться там с биомолекулами. Оставшаяся в цитозоле в виде свободных ионов или растворимых комплексов фракция симпластическим или трансклеточным путем перемещается из корня в побег и далее – в листья растений по заряженным участкам ксилемы, либо увлекается с транспирационным потоком воды [14].

Хлорофилл является важнейшим компонентом фотосинтетического аппарата листьев. Его содержание зависит от жизнедеятельности организма и генетической природы. В связи с этим количественное определение хлорофилла может использоваться как физиологический показатель для характеристики онтогенетических особенностей растений и как показатель реакции растительного организма на условия произрастания [7].

В результате изучения содержания хлорофилла установили, что в проростках огурца, полученных на загрязненном почвогрунте, данный показатель по сравнению с контролем (0,048 г/л вытяжки) в два раза ниже (0,024 г/л вытяжки), что связано с ингибированием процесса синтеза пигмента в тканях под воздействием тяжелых металлов.

При исследовании активности каталазы определено, что внесение в почвогрунт солей меди и кадмия понижало ее активность в 1,5–2 раза, что указывает либо непосредственно на блокаду активности фермента, либо на нарушение его структуры.

Содержание углеводов, в частности сахарозы, может изменяться в различных пределах, однако, в проведенных нами исследованиях наблюдается явная тенденция снижения ее количества в опытных вариантах в среднем в 3–3,5 раза. При этом наиболее ингибирующее действие на синтез и накопление сахарозы в тканях проростков огурца оказали ионы меди, что связано с их специфическим и целенаправленным действием в данном блоке метаболизма. В контроле же исследуемый показатель варьировал в пределах 70–75 мкг/г растительного материала, а в опытных вариантах от 20,5 до 24 мкг/г растительного материала при внесении меди кадмия соответственно.

Протеин является простым белком и участвует в азотном обмене растительных клеток. Следует отметить, что ионы кадмия не оказали существенного влияния на содержание протеина. При этом данный показатель достоверно не различался с контрольным составляя в среднем 0,23 %. Однако при воздействии

ионов меди наблюдалось явное снижение содержания протеина до 0,1 %, т.е. выраженное влияние на механизм синтеза белка.

**Выводы.** Выявлено негативное воздействие ионов тяжелых металлов (медь и кадмий) на рост вегетативных органов огурца на ранних стадиях развития, что выражается в виде замедления развития длины побегов, в уменьшении количества листьев, нарушении их окраски и деформации листовой пластинки. Ионы тяжелых металлов способны проникать и накапливаться в клетках корня, стебля и листа огурца, вызывая их отравление. При этом наибольшее их количество присутствует в клеточных стенках эпидермы, колленхимы и паренхимы. При внесении в почвогрунт тяжелых металлов активность фермента каталазы снижается в 1,5–2,0 раза по сравнению с контролем; также наблюдается явная тенденция уменьшения количества сахаразы в 3–3,5 раза и содержания хлорофилла в листьях исследуемых сортов огурца. Ионы кадмия не оказывали существенного влияния на содержание протеина, тогда как ионы меди способствовали снижению данного показателя в среднем в два раза по сравнению с контролем, что указывает на нарушение белкового обмена в исследуемых растениях.

### Литература

1. *Алексеев Ю.В.* Тяжелые металлы в почвах и растениях. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 137 с.
2. *Алексеева А.С.* Влияние применения нетрадиционных органических удобрений на накопление тяжелых металлов и биологическую активность дерново-подзолистых супесчаных почв: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.04. – М., 2002. – 145 с.
3. *Беспамятнов Г.П., Кротов Ю.А.* Предельно-допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. – Л.: Химия, 1985. – 528 с.
4. *Виноградов Л.П.* Основные закономерности в распределении микроэлементов между растением и средой // Микроэлементы в жизни растений и животных. – М.: Изд-во АН СССР, 1982. – С. 7–20.
5. *Войтович Н.В.* Плодородие почв Нечерноземной зоны и его моделирование. – М.: Колос, 1997. – 45 с.
6. *Гребенников А.М., Ельников И.И.* Экологические функции культурной растительности в агроценозе // Агрохимия. – 2001. – № 9. – С. 115–121.
7. *Ильин В.Б.* Тяжелые металлы в системе почва – растение. – Новосибирск: Наука, 1991. – 151 с.
8. *Мажайский Ю.А., Евтюхин В.Ф., Резникова А.В.* Экология агроландшафта Рязанской области. – М.: Изд-во МГУ, 2001. – 95 с.
9. *Овцов Л.П.* Экологическая оценка осадков сточных вод и навозных стоков в агроценозе. – М.: Изд-во МГУ, 2000. – 15 с.
10. *Первунина Р.И., Малахов С.Г.* Подвижность металлов, выпавших на почву в составе выбросов промышленных предприятий // Миграция загрязняющих веществ в почвах и сопредельных средах. – Л.: Гидропромиздат, 1989. – С. 97–100.
11. *Плеханова И.О., Кутукова Ю.Д., Обухов А.И.* Накопление тяжелых металлов сельскохозяйственными растениями при внесении осадков сточных вод // Почвоведение. – 1995. – №12. – С.1530–1536.
12. *Пронина Н. Б.* Экологические стрессы. – М.: Изд-во МСХА, 2000. – 312 с.
13. *Реймерс Н.Ф.* Охрана природы и окружающей человека среды: сл.-справ. – М.: Просвещение, 1992. – 320 с.
14. *Серегин И.В., Иванов В.Б.* Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях // Физиология растений – 1997. – №6, Т.44. – С.915–921.
15. *Чаплыгина И.А., Фомина Н.В.* Биохимия растений: лабораторный практикум. – Красноярск: Изд-во КрасГАУ, 2009. – 182 с.