

УДК 577.152'1:581.142:633.19:546.815:546.48

Амилолитическая активность проростков озимой тритикале в условиях моно- и полиэлементного загрязнения ионами свинца и кадмия

Н.И. Дроздова, М.Н. Гатальская, А.В. Овсянкова

Изучено влияние моноэлементного и полиэлементного загрязнения ионами свинца и кадмия в концентрациях 1, 2, 4 и 10 ПДК соответственно на амилолитическую активность проростков озимой тритикале. Установлено достоверное уменьшение активности α - и β -амилаз при концентрациях ионов металлов в среде прорастания, соответствующих 2, 4 и 10 ПДК по отношению к контролю на 8,5 %–42 % при полиэлементном загрязнении, на 4,23 %–51,82 % при моноэлементном.

Ключевые слова: ионы свинца и кадмия, α -амилаза, β -амилаза, ферментативная активность, проростки озимой тритикале.

The influence of monoelement and polyelement pollution by ions of lead and cadmium in concentration of 1, 2, 4 and 10 MPC respectively on amylolitic activity of sprouts winter triticale is studied. Reliable reduction of activity α - and β -amylases is established at concentration of ions of metals in the environment of germination, the corresponding 2, 4 and 10 MPC in relation to control for 8,5 %–42 % at polyelement pollution, for 4,23 %–51,82 % at monoelement.

Keywords: lead and cadmium ions, α - and β -amylases, the ferment activity, seedling of winter triticale.

Введение. Уровень антропогенного воздействия на природную среду непрерывно растет и чрезвычайно нежелательным его результатом является химическое загрязнение почв тяжелыми металлами. Одними из наиболее токсичных элементов являются свинец и кадмий, относящиеся к I классу опасности. Высокие концентрации соединений свинца и кадмия в почвах оказывают токсическое влияние на растения (снижают поглощение кислорода корнями, ингибируют транспорт электронов и протонов в митохондриях, снижают активность ферментов цикла Кребса и пентозофосфатного пути), что влечет за собой снижение урожайности, качества продукции и может привести к их гибели. Ионы свинца и кадмия оказывают ингибирующее влияние на ферменты амилолитического комплекса, которые являются ключевыми в энергообеспечении процессов прорастания и развития растений, так как гидролизуют крахмал с образованием легко мобилизуемого источника энергии [1].

Сухие семена быстро поглощают воду, набухают и начинают прорастать. Характер и интенсивность физиологических процессов, протекающих в прорастающих семенах, зависят от активности ферментативного комплекса зерна и от условий окружающей среды. Главная особенность прорастания и его общая биохимическая направленность – распад в эндосперме и семядолях высокомолекулярных веществ до растворимых низкомолекулярных при участии влаги и под действием ферментов, прежде всего, амилолитического комплекса с высокой активностью α -амилазы [2]. Частично ферменты находятся в эндосперме или зародыше в связанном, неактивном состоянии и при набухании переходят в активное состояние [3]. Под влиянием амилазы (состоящей из α - и β -амилазы) крахмал в эндосперме зерновки переводится в декстрины и мальтозу. Мальтоза при участии мальтазы расщепляется при прорастании семян до глюкозы. Одновременно с накоплением глюкозы идет образование сахарозы, которая используется растущим проростком [4].

Скорость расщепления крахмала у однодневных зерновок более чем в 2 раза ниже, чем у четырехдневных. В однодневных проростках главную роль в амилолизе играют β -амилазы, повышающие свою активность в результате активации латентных форм фермента. На ранних этапах прорастания проявляется и небольшая доля активности α -амилаз, которая постоянно нарастает, благодаря индукции синтеза гибберелловой кислотой α -амилазы «прорастания», ее активации и секреции α -амилаз «созревания». И.Ф. Александрова и др. [5] установили, что максимум активности суммарных амилаз в процессе прорастания семян пшеницы обычно приходится на 3–6-й день. Опытным путем установлено, что в отсутствие экзогенной гиббер-

реловой кислоты тепловое воздействие практически не изменяет степени амилолиза как у однодневных, так и у четырехдневных прорастающих зерновок. Предполагается, что мало-существенные сдвиги в активности амилаз могут быть результатом двух разнонаправленных адаптационных реакций. С одной стороны, амилолиз, вызывая расщепление крахмала, способствует повышению осмотического давления и удержанию воды. С другой стороны, при повышении температуры замедляются ростовые процессы, что требует притока меньшего количества углеводов в надземную часть и корни.

Из литературных источников известно, что активность α -амилазы регистрируется в прорастающем семени ярового ячменя только в микрофенологических фазах прорастания семян «вилка», когда происходит разрыв колеоризы корешком прорастающего семени. А активность β -амилазы присутствует в сухом семени и возрастает в процессе его прорастания. Варьирование активности α -амилазы снижается в процессе прорастания семени, а варьирование активности β -амилазы, наоборот, возрастает [6]. Активаторами α -амилазы являются эндогенные фитогормоны и ионы хлора [7].

Установлено, что уменьшение активности ферментов в зерне приводит к замедлению процесса гидролитического расщепления отложенных в эндосперме сложных веществ, необходимых для образования более простых, растворимых в воде, доступных для подачи в развивающийся росток. При этом значительно уменьшается газообмен в зерне, а, следовательно, угнетаются и ростовые процессы.

Многие из тяжелых металлов являются ингибиторами ферментов, так как обладают высоким сродством к серосодержащим лигандам и образуют с ними прочные соединения, снижая активность многих ферментов. Это вызывает разнообразные нарушения метаболизма клеток, с чем связана высокая токсичность тяжелых металлов [8].

Цель работы: изучить влияние ионов свинца и кадмия на амилолитическую активность проростков озимой тритикале при поли- и моноэлементном загрязнении.

Объектом исследования являлось зерно оз. тритикале сорта «Динаро».

Материалы и методы исследования. Для изучения влияния различных концентраций свинца и кадмия при поли- и моноэлементном присутствии в среде прорастания выделены контрольные и опытные группы, каждая из которых содержала по 5 г зерна. Контрольная и опытные группы проращивались в течение трех суток с добавлением соответственно дистиллированной воды (20 мл) и растворов солей $Pb(NO_3)_2$ и $Cd(NO_3)_2$ с концентрациями, соответствующими 1; 2; 4 и 10 ПДК каждого металла (20 мл) (рисунок 1).

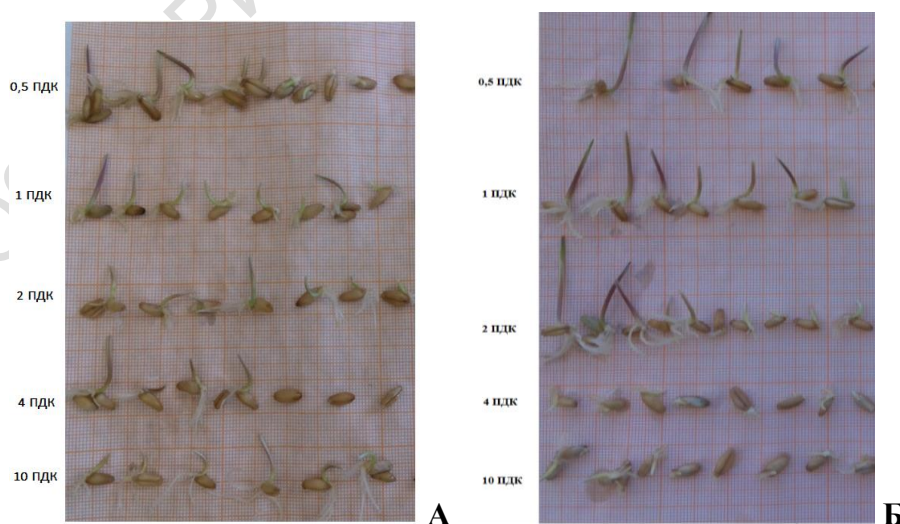


Рисунок 1 – Зерна оз. тритикале на третьи сутки проращивания в среде с ионами свинца (А) и ионами кадмия (Б)

Перед закладкой эксперимента атомно-эмиссионным методом проведено исследование зерна на содержание тяжелых металлов (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание тяжелых металлов в зерне оз. тритикале, в мг/кг

Исследуемые образцы	Содержание металла	
	Свинец	Кадмий
Оз. тритикале	0,26	0,029

Примечание: ПДК Cd^{2+} – 0,10 мг/кг; ПДК Pb^{2+} – 0,50 мг/кг.

Таким образом, показатели не превышали допустимые пределы содержания свинца и кадмия в зерновой продукции.

В ходе эксперимента наблюдались отличия между проростками в зависимости от условий проращивания. Отмечали, что всхожесть зерен в контрольных и опытных группах находилась примерно на одном уровне (95 %–98 %). С увеличением концентраций ионов металлов в среде проращивания ростовые процессы угнетались [9], [10].

Определение активности амилазы проводили фотоколориметрическим методом [11] после предварительного измерения морфометрических параметров. Активность выражали в мг гидролизованного крахмала за 60 мин/г сухой массы.

Результаты исследования. В ходе исследований проанализированы изменения в активности α - и β -амилаз под действием различных концентраций ионов свинца и кадмия при полиэлементном загрязнении в проросших зернах озимой тритикале сорта «Динаро». Данные приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние ионов тяжелых металлов на активность ферментов в проростках оз. тритикале

Условия эксперимента	Активность α -амилазы	Активность β -амилазы	Активность α - и β -амилазы
	в мг гидролизованного крахмала за 60 мин/г сухой массы		
Свинец			
Контроль	25,32 ± 0,64	13,18 ± 0,48	38,50 ± 0,50
ПДК 1	24,37 ± 0,41	12,62 ± 0,64	36,87 ± 0,28
ПДК 2	23,41 ± 0,58	10,73 ± 0,53	34,17 ± 0,27
ПДК 4	20,43 ± 0,38	9,62 ± 0,38	31,35 ± 0,37
ПДК 10	18,18 ± 0,29	7,62 ± 0,32	25,8 ± 0,18
Кадмий			
Контроль	25,32 ± 0,64	13,18 ± 0,48	38,50 ± 0,50
ПДК 1	23,53 ± 0,26	12,65 ± 0,67	36,83 ± 0,39
ПДК 2	22,35 ± 0,52	10,31 ± 0,37	32,70 ± 0,28
ПДК 4	19,98 ± 0,20	9,28 ± 0,50	29,23 ± 0,33
ПДК 10	16,93 ± 0,71	6,35 ± 0,61	23,13 ± 0,37
Свинец и кадмий			
Контроль	25,33 ± 0,73	13,21 ± 0,51	38,63 ± 0,64
ПДК 1	24,63 ± 0,41	12,70 ± 0,41	37,33 ± 0,36
ПДК 2	23,17 ± 0,36	11,33 ± 0,30	34,50 ± 0,44
ПДК 4	20,37 ± 0,26	9,88 ± 0,28	30,25 ± 0,34
ПДК 10	17,93 ± 0,41	7,62 ± 0,44	25,55 ± 0,47

Было установлено, что достоверное ингибирование суммарной активности амилазы при полиэлементном загрязнении постепенно усиливается с увеличением предельно допустимых концентраций ионов свинца и кадмия. Суммарная активность амилазы в среде с концентрациями ионов металлов соответствующими 2; 4 и 10 ПДК уменьшалась по сравнению с контролем на 10,4 %; 21,4 % и 33,64 % соответственно. По сравнению с контролем активность α -амилазы в аналогичных снижалась соответственно на 8,5 %; 19,5 % и 29 %; активность β -амилазы – на 14 %; 25 % и 42 %. Из чего следует, что β -амилаза оказалась более чувствительной к полиэлементному загрязнению среды прорастания.

Для проверки гипотезы о достоверном влиянии ионов тяжелых металлов на изменение активности амилазы в проростках озимой тритикале был проведен однофакторный дисперсионный анализ, результаты которого представлены на рисунке 2. Установлено, что различия между средними величинами активности амилаз во всех вариантах опыта статистически значимы. Показатели активности α - и β -амилаз при полиэлементном загрязнении кадмием и свинцом в концентрации 2; 4 и 10 ПДК достоверно отличаются от активности амилазы в контроле.

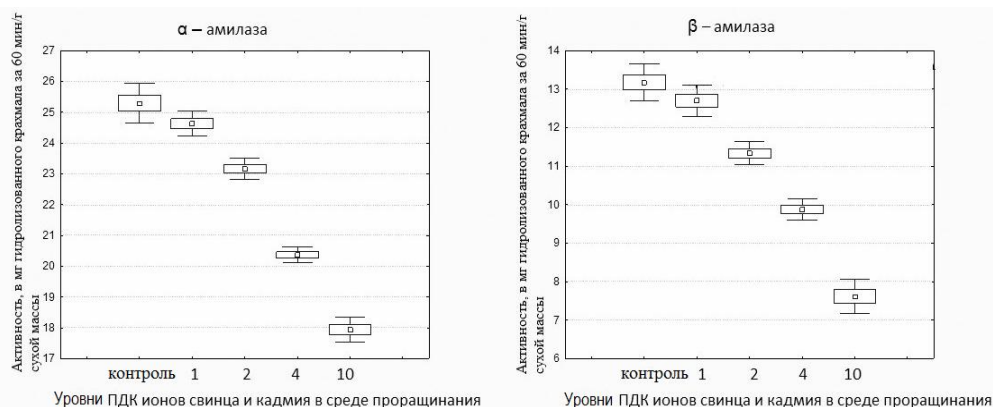


Рисунок 2 – Изменение активности α - и β -амилаз проростков озимой тритикале при полиэлементном загрязнении

Для сопоставления степени влияния двух элементов (свинца и кадмия) на амилолитическую активность проростков озимой тритикале проведено исследование активности α - и β -амилаз в условиях моноэлементного загрязнения.

Установлено, что ингибирование суммарной активности амилазы ионами свинца возрастало с увеличением предельно допустимых концентраций элемента. Суммарная активность амилаз в среде с концентрациями ионов свинца 1; 2; 4 и 10 ПДК уменьшалась по сравнению с контролем на 4,23 %; 11,25 %; 18,57 % и 33 %, активность α -амилазы по сравнению с контролем убывала соответственно на 3,75 %; 7,54 %; 19,31 % и 28,20 %. Установлено, что по сравнению с контролем активность β -амилазы в средах с концентрацией ионов свинца 2; 4 и 10 ПДК снизилась соответственно на 18,59 %; 27,01 % и 42,19 %, что является более значимым показателем по сравнению со снижением активности α -амилазы.

По результатам однофакторного дисперсионного анализа подтверждена статистическая значимость наблюдаемых различий как с контрольным вариантом, так и в условиях возрастания предельно допустимых концентраций ионов свинца (рисунок 3)

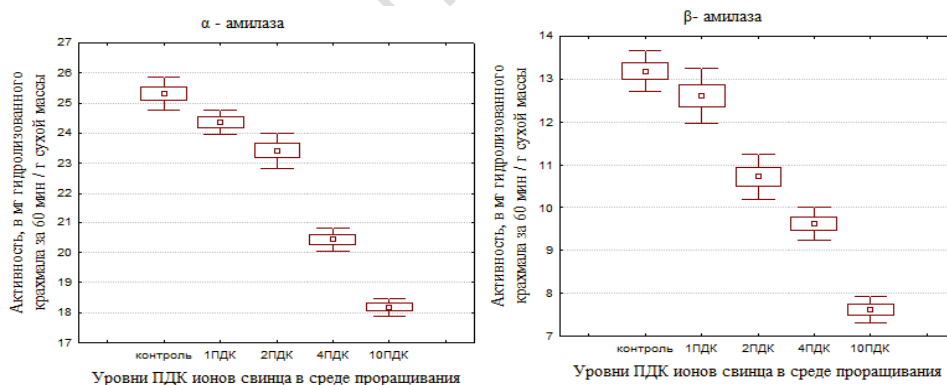


Рисунок 3 – Изменение активности α - и β -амилаз проростков озимой тритикале при загрязнении ионами свинца

При изучении влияния ионов кадмия на ингибирование активности амилаз установлено, что суммарная активность амилаз и активность α -амилазы в среде с концентрациями ионов кадмия соответствующими 1; 2; 4 и 10 ПДК уменьшалось по сравнению с контролем на 4,34 %–39,92 % и 7,07 %–33,14 % соответственно. Ингибирующее действие ионов кадмия на активность β -амилазы достоверно проявлялось при концентрации ионов от 2 ПДК и выше. По сравнению с контролем активность β -амилазы в средах с концентрацией 2; 4 и 10 ПДК снижалась соответственно на 21,78 %; 29,59 % и 51,82 %. Таким образом установлено, что активность β -амилазы при действии высоких концентраций ионов кадмия ингибируется в большей степени, чем активность α -амилазы.

Проведен однофакторный дисперсионный анализ, результаты которого подтверждают достоверность различий активности амилаз между опытными группами и контролем (рисунок 4).

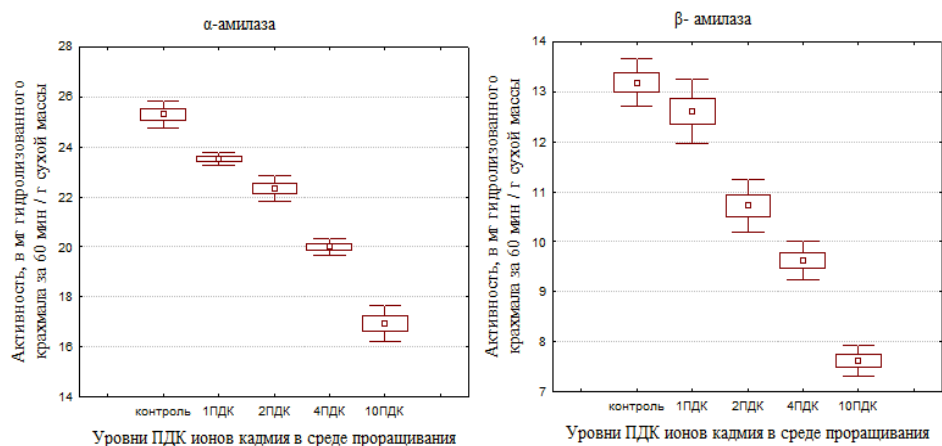


Рисунок 4 – Изменение активности α - и β -амилаз проростков озимой тритикале в присутствии ионов кадмия

При сопоставлении активности амилаз в условиях моноэлементного загрязнения среды ионами свинца и кадмия установленные различия носят статистически значимый характер, что подтверждено результатами однофакторного дисперсионного анализа (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа по изучению влияния моноэлементного загрязнения среды на суммарную активность амилаз

Показатели	F	P	F критическое
Активность α - и β -амилазы			
Pb ²⁺ – Cd ²⁺ 1 ПДК	0,03	0,86	4,96
Pb ²⁺ – Cd ²⁺ 2 ПДК	85,66	3,22E-06	4,96
Pb ²⁺ – Cd ²⁺ 4 ПДК	109,42	1,05E-06	4,96
Pb ²⁺ – Cd ²⁺ 10 ПДК	263,29	1,64E-08	4,96

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ионы кадмия оказывают достоверно большее ингибирующее действие на активность амилолитических ферментов, чем ионы свинца при концентрациях от 2 ПДК и выше.

На основании процедуры корреляционного анализа выявлена достоверная обратная связь суммарной активности амилаз с концентрацией ионов свинца и кадмия ($r = -0,97$; $-0,98$) (рисунок 5).

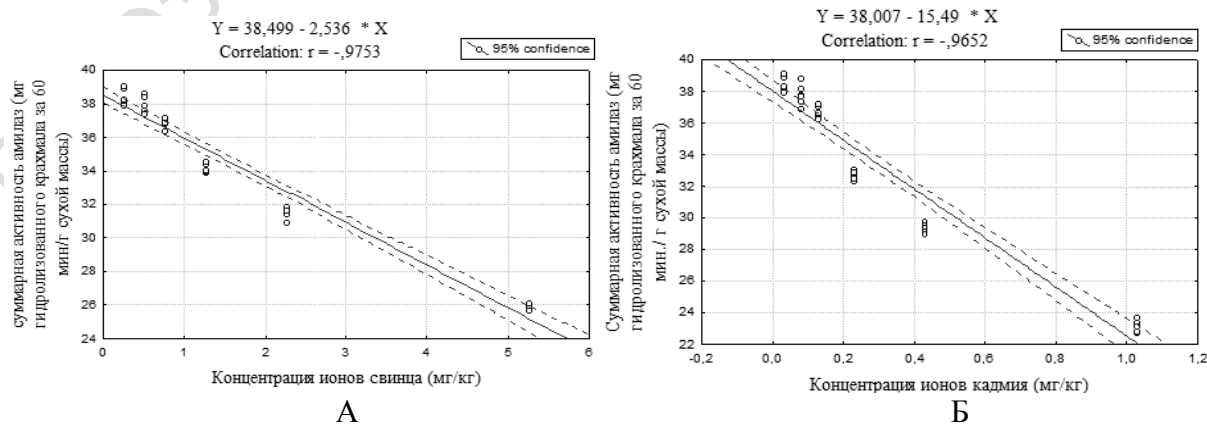


Рисунок 5 – Корреляционная связь концентраций ионов свинца (А) и кадмия (Б) с суммарной активностью амилаз

Заключение.

1. Установлено достоверное ингибирующее влияние ионов свинца и кадмия в концентрациях от 2 до 10 ПДК на активность α - и β -амилаз при моно- и полиэлементном загрязнении среды.

2. Наиболее значимое влияние на ингибирование активности амилолитических ферментов в проростках озимой тритикале сорта «Динаро» оказывают ионы кадмия, снижающие активность амилаз по сравнению с контролем на 4,34 %–39,92 %. В присутствии ионов свинца аналогичные параметры снижались на 4,23 %–33 %. Установленные различия носят статистически значимый характер.

3. Выявлена достоверная обратная связь суммарной активности амилаз с концентрацией ионов свинца и кадмия, выражающаяся следующими значениями коэффициентов парной корреляции $r = -0,97; -0,98$.

Гипотеза о достоверном влиянии высоких концентраций ионов свинца и кадмия на амилолитическую активность проростков озимой тритикале подтверждена.

Литература

1. Кузнецов, В.В. Физиология растений: учебник / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М. : Высш. шк., 2006. – 742 с.
2. Костин, В.И. Физиологический механизм воздействия пектина и микроэлементов при прорастании семян зерновых культур / В.И. Костин, В.А. Исачев, О.Г. Музурова // Вестник РАСХН. – 2006. – № 4. – С. 38–39.
3. Якушкина, Н.И. Физиология растений: учеб. для студентов вузов, обучающихся по специальности «Биология» / Н.И. Якушкина, Е.Ю. Бахтенко. – М. : Гуманитар. изд. центр ВЛАДОС, 2005. – С. 321.
4. Кретович, В.Л. Основы биохимии растений / В.Л. Кретович. – М. : Высш. Шк., 1971. – Сс. 81, 87.
5. Александрова, И.Ф. Влияние гипертермии и экзогенной гибберелловой кислоты на активность амилаз в прорастающих зерновках пшеницы / И.Ф. Александрова, А.А. Веселова, А.С. Лебедева // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобочевского. – 2007. – № 5. – С. 65–67.
6. Игнатенко, И.С. Влияние экологических условий года репродукции семян на развитие амилолитической активности в прорастающих семенах ярового ячменя / И.С. Игнатенко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского ГАУ. – 2011. – № 70. – С. 617–626.
7. Симонова, Е.Н. Активность ферментов в прорастающих семенах мягкой озимой пшеницы после обработки электроактивированными растворами / Е.Н. Симонова, Н.Г. Игнатьева // Вестник аграрной науки Дона. – 2011. – № 3. – С. 81–86.
8. Мазей, Н.Г. Влияние ионов Cd^{2+} и Pb^{2+} на рост и развитие растений пшеницы / Н.Г. Мазей // Известия Пензенского государственного педагогического университета. Серия: Естественные науки. – 2008. – № 10 (14). – С. 33–38.
9. Гатальская, М.Н. Влияние ионов свинца и кадмия на морфометрические параметры проростков озимой тритикале / М.Н. Гатальская // Молодежь – науке. 2017 : материалы молодежных научно-практических конференций Псковского государственного университета по итогам научно-исследовательской работы в 2016/2017 учебном году. – Псков : Издательство Псков ГУ, 2017. – Т. II. Ч. I. – С. 28–30.
10. Гатальская, М.Н. Оценка влияния ионов свинца на морфометрические параметры проростков оз. тритикале / М.Н. Гатальская, А.В. Овсянкова, Н.И. Дроздова // Актуальные научные исследования в современном мире: сб. научных трудов. – 2017. – № 12 (32). – С. 66–70.
11. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков. – Л. : Агропромиздат, 1987. – 430 с.