

На правах рукописи

Куликова Наталья Александровна

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ
ПО ОТНОШЕНИЮ К РАСТЕНИЯМ В ВОДНОЙ И ПОЧВЕННОЙ СРЕДАХ
В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Специальности 03.00.16 – Экология и 03.00.27 – Почвоведение

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук



Москва-2008

Работа выполнена на кафедре общего земледелия факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор Перминова И.В.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, академик РАСХН

Спиридонов Ю.Я.

Доктор химических наук, член-корреспондент РАН

Тарасова Н.П.

Доктор биологических наук, профессор

Щеглов А.И.

Ведущая организация: Почвенный институт имени В.В. Докучаева РАСХН

Защита состоится 28 ноября 2008 г. в 14-00 на заседании Диссертационного Совета Д 501.001.55 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д. 1, корпус 12 (биологический факультет), аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,

кандидат биологических наук



Н.В. Карташева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Возрастающая антропогенная нагрузка на окружающую среду обусловила возникновение такой глобальной задачи современности как целенаправленное регулирование нарушенного равновесия в экосистемах. Решение этой задачи включает в себя изучение детоксификации загрязняющих веществ и поиск безопасных средств защиты организмов от повреждающего действия токсикантов. В качестве таких средств защиты могут выступать природные физиологически активные соединения, к которым относятся гуминовые вещества (ГВ), содержащиеся во всех природных средах, включая природные воды, почвы, торфа, сапропели и угли. Образование ГВ представляет собой второй по масштабности после фотосинтеза процесс трансформации органического вещества в природе, в который вовлекается около 20 Гт углерода в год. ГВ выполняют ряд важных экологических функций в биосфере: аккумулятивную, транспортную, регуляторную, физиологическую и защитную. Особую актуальность в последнее время приобретает исследование защитной функции ГВ с целью ее дальнейшего практического применения, так как именно она отвечает за поддержание равновесия в экосистемах, подверженных сильной антропогенной нагрузке. Следовательно, установление механизма защитного действия ГВ позволит более эффективно использовать существующие гуминовые стимуляторы роста растений в сельском хозяйстве, а также указать пути к созданию нового поколения средств защиты растений на основе ГВ, например, гуминовых детоксикантов и биоактиваторов.

В настоящее время общепринятым является положение о том, что защитная функция ГВ в условиях химического стресса обеспечивается их способностью связывать загрязняющие вещества в комплексы, недоступные для живых организмов. При таком понимании защитного действия ГВ практически игнорируется роль их физиологической активности в процессах детоксификации загрязненных сред. Кроме того, при таком подходе остаётся нерешённой проблема защитного действия ГВ в условиях других абиотических стрессов, таких как неблагоприятная температура, недостаток влаги, засоление и др. Причиной этого является отсутствие систематических исследований по роли физиологической активности в защитной функции ГВ. Поэтому целью работы было изучить природу защитного действия ГВ по отношению к растениям во взаимосвязи с их физиологической активностью в условиях различных абиотических стрессов в водной и почвенной средах и предложить пути практического использования полученных знаний для создания средств защиты нового поколения на основе ГВ.

Цель работы

Цель работы состояла в изучении природы защитного действия ГВ по отношению к растениям в водных и почвенных средах в условиях различных абиотических стрессов и оценке перспективности применения природных и модифицированных гуминовых препаратов в качестве средств защиты растений. В работе были поставлены следующие основные задачи:

- выделить и охарактеризовать ГВ из различных природных сред;
- изучить защитное действие ГВ и выявить его основные закономерности в условиях различных абиотических стрессов, включая присутствие токсикантов, железодефицитный хлороз, водный, солевой и температурный стрессы;
- изучить взаимодействие ГВ с клетками и растениями и предложить концептуальную модель защитного действия ГВ;
- оценить перспективность применения природных и модифицированных гуминовых препаратов в качестве средств защиты растений (детоксикантов, стимуляторов роста, корректоров хлороза, биоактиваторов).

Научная новизна

На основании количественной оценки детоксицирующих свойств ГВ в присутствии токсикантов показано, что защитное действие ГВ в почвенных средах обусловлено, прежде всего, образованием нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как в водных средах значительный вклад может вносить собственная биологическая активность ГВ. В случае высоких констант связывания (тяжёлые металлы), ведущую роль в защитных свойствах ГВ играет образование нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как при слабом химическом взаимодействии (гербициды) основную роль играет собственная физиологическая активность ГВ.

Установлено, что защитное действие ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов более выражено в водных, чем почвенных средах, что связано со снижением доступности ГВ для растений.

Впервые показана перспективность использования модифицированных ГВ в качестве средств защиты растений нового поколения, а именно: хинон-обогащенных гуминовых производных – в качестве детоксикантов почв, загрязнённых тяжёлыми металлами, гуматов железа – в качестве корректоров хлороза у растений, обогащённых кремнием ГВ – в качестве биоактиваторов.

Впервые проведена численная оценка кинетики поглощения ГВ растениями с использованием меченных тритием препаратов. Показано, что константы Михаэлиса-Ментен ГВ лежат в диапазоне, характерном для ионов и индивидуальных веществ, поступающих в растения, а максимальная скорость поглощения ГВ – на несколько порядков ниже. Установлено, что поступление ГВ в растения происходит по механизму активного транспорта и напрямую связано со скоростью метаболизма.

С использованием автордиографии установлено, что ГВ аккумулируются преимущественно в корнях растений. Показано, что повышенное содержание ГВ наблюдается в апикальных участках корней и побегов.

Установлено, что ГВ, поступившие в растения, аккумулируются в липидной фракции. С использованием метода масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с Фурье преобразованием впервые показано, что продукты метаболизма ГВ присутствуют в составе ненасыщенных жирных кислот. Предложена концептуальная модель защитного действия ГВ, основанная на их участии в липидном обмене растений.

Практическая значимость

Выявленные основные закономерности защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов в водных и почвенных средах могут служить основой для создания нового поколения средств защиты растений на основе ГВ.

Установленные зависимости «структура – детоксицирующие свойства ГВ» могут быть использованы при выборе гуминовых препаратов, оптимальных для рекультивации почв, загрязненных гербицидами и тяжелыми металлами.

Показана перспективность использования модифицированных ГВ, искусственно обогащенных кислородсодержащими функциональными группами, для детоксификации сред, загрязненных тяжелыми металлами.

Продемонстрирована возможность использования гуминовых препаратов, обогащенных железом, для коррекции железодефицитного хлороза.

Показана перспективность использования обогащенных кремнием ГВ в качестве биоактиваторов растений в условиях солевого стресса.

Полученные значения констант связывания атразина ГВ могут быть использованы для расчета форм существования атразина в окружающей среде при построении моделей биогеохимического цикла и оценки степени загрязнения почв.

Полученные данные по взаимодействию атразина с почвами в присутствии лакказы могут быть использованы для разработки биотехнологических подходов к рекультивации почв, загрязненных гербицидами сим-триазинового ряда.

На примере ГВ предложен способ исследования поглощения и распределения в растениях сложных высокомолекулярных соединений природного происхождения с использованием меченных тритием препаратов.

Предложен способ обработки данных альгологического тестирования токсичности водных сред, позволяющий учитывать мешающее влияние ГВ.

Положения, выносимые на защиту

- различие в эффективности защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов в водных и почвенных средах;
- основные закономерности поглощения ГВ растениями и распределения в них;
- положение о неспецифической природе защитного действия ГВ и его концептуальная модель;
- возможность усиления защитных свойств гуминовых препаратов путем направленного введения функций, способствующих снятию абиотических стрессов.

Апробация

Отдельные части работы были представлены на Международных конференциях студентов и аспирантов «Ломоносов-96» и «Ломоносов-98» (Москва, 1996, 1998); на 16-ом Всемирном конгрессе по почвоведению (Монпелье, 1998), 9-ой ежегодной конференции SETAC-Europe (Лейпциг, 1999); 10, 11, 12 и 13-ой международных конференциях IHSS в 1997 (Анахайм, США), 2000 (Тулуза, Франция), 2002 (Бостон, США) и 2006 (Карлсруэ, ФРГ); научно-практическом семинаре при поддержке НАТО

«Use of humates to remediate polluted environments: from theory to practice» (Звенигород, 2002); II Московском международном конгрессе по биотехнологии «Состояние и перспективы развития» (Москва, 2003); научно-практической конференции «Современные проблемы тканевой терапии и перспективы использования БАВ» (Одесса, 2003); 12-м международном симпозиуме по загрязнению окружающей среды (Анталья, 2003); 4-м съезде Докучаевского общества почвоведов (Новосибирск, 2004); на Международной научной конференции «Современные проблемы загрязнения почв» (Москва, 2004); Всероссийской конференции «Экспериментальная информация в почвоведении: теория и пути стандартизации» (Москва, 2005); международной конференции «Biocatalysis-2005: fundamentals and application» (Санкт-Петербург, 2005); 10 и 11 симпозиумах северного отделения I.H.S.S. «Character of natural organic matter and its role in the environment» в 2005 (Рига, Латвия) и 2007 (Йонсуу, Финляндия); 3 и 4 Всероссийских конференциях «Гуминовые вещества в биосфере» в Санкт-Петербурге (2005) и Москве (2007); 5 Российской конференции по радиохимии (Дубна, 2006); научной конференции Ломоносовские чтения (Москва, 2006); VII конгрессе Итальянского отделения I.H.S.S. (2007); на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 59 работ, включая 28 статей (из них 10 в журналах, рекомендованных ВАК), 1 патент и 30 тезисов международных и всероссийских конференций.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является результатом многолетних (1997-2008 гг) исследований автора. Автору принадлежит решающая роль в выборе направления исследований, развитию и проверке экспериментальных подходов, предложенных в работе, а также в обсуждении, оформлении и обобщении полученных результатов. Экспериментальная работа выполнена автором самостоятельно и в соавторстве с российскими и зарубежными коллегами. В совместных исследованиях личный вклад автора заключался в постановке задачи, в непосредственном участии и руководстве при проведении экспериментальной работы, в интерпретации полученных результатов и оформлении их в виде публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Выделение и характеристика ГВ различных природных сред

Отличительной особенностью ГВ является стохастический характер, обусловленный особенностями их образования в результате отбора биотермодинамически устойчивых структур. Как следствие, к фундаментальным свойствам ГВ относятся нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность. Поэтому для ГВ неприменимо понятие молекулы, а вероятную схему их строения представляют с

помощью структурной ячейки – минимального по размеру фрагмента молекулы, который содержит все важнейшие структурные единицы. Сложность строения ГВ хорошо иллюстрирует гипотетическая структурная формула ГВ почв, опубликованная в 1970 г. Кляйнхемпелем (рис. 1.1). Указанная формула представляет собой попытку одновременно сохранить детальное описание структуры ГВ и показать ее статистический характер. Это достигается за счет чрезмерной громоздкости формулы, в которой автор приводит практически все возможные элементы структуры и способы их сочленения. Данная формула наиболее полно отражает набор структурных фрагментов ГВ, хотя она неоднократно подвергалась критике, в частности, в связи с чрезмерно высоким содержанием азота.

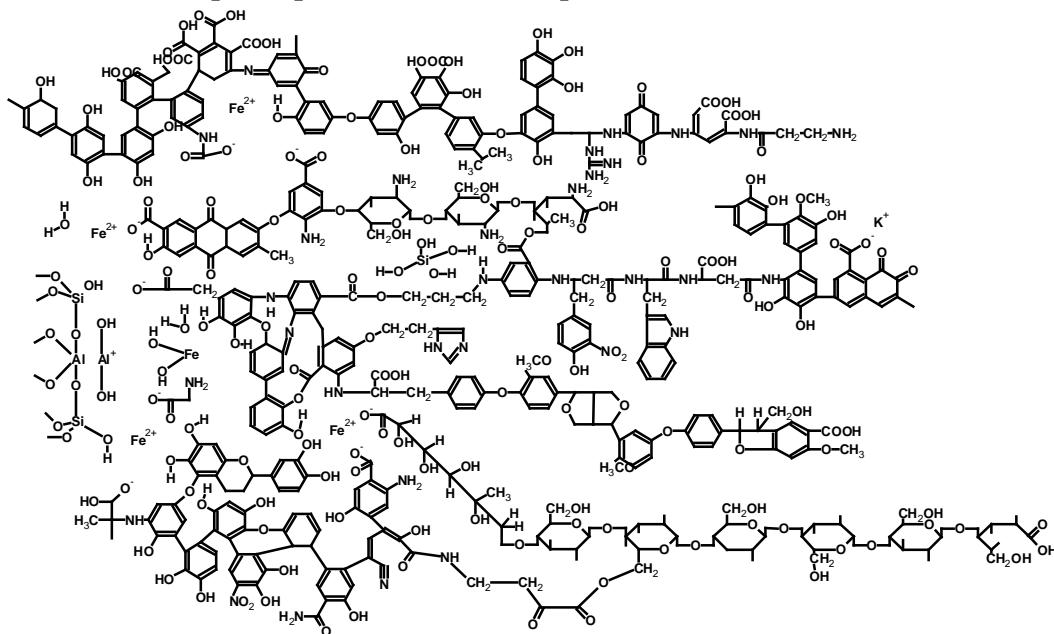


Рис. 1.1. Гипотетический структурная формула ГВ почв [Kleinhempel D.//Albrecht-Thaer-Archiv., 1970, 14(1), pp.3-14.].

Как видно из приведенной структурной формулы, по своей химической природе ГВ представляют собой нерегулярные сополимеры ароматических оксиполикарбоновых кислот с включениями азотсодержащих и углеводных фрагментов. Указанное строение – наличие каркасной части, т.е. ароматического углеродного скелета, замещенного алкильными и функциональными группами, среди которых преобладают карбоксильные, гидроксильные и метоксильные, и периферической части, обогащенной полисахаридными и полипептидными фрагментами, – является общим для ГВ всех источников происхождения.

Отсутствие адекватного аналитического обеспечения и методологических подходов к анализу и численному описанию строения ГВ привело к тому, что, определение класса ГВ до сих пор основано на способе их экстракции из природных объектов, а общепринятая классификация – на процедуре фракционирования. ГВ подразделяют на гумин (нерастворим во всем диапазоне рН), гуминовые кислоты (ГК, нерастворимы при рН < 2) и фульвокислоты (ФК, растворимы во всем диапазоне рН). Последние два класса объединяют под общим названием гумусовые кислоты. Эта схема дополняется иногда также выделением гиматомелановых кислот (ГМК), отделяемых воздействием на сырой осадок ГК этанолом.

В связи с тем, что ГВ характеризуются нестехиометричностью состава, нерегулярностью строения и гетерогенностью структурных элементов, для проведения исследований необходимо было создать представительную выборку препаратов ГВ с широким разнообразием состава и свойств, адекватную стохастическому характеру объекта. Всего в работе было использовано 66 препаратов ГВ из различных природных источников, включая торфа, почвы, угли, природные воды и донные отложения, а также 36 препаратов модифицированных ГВ. ГВ были охарактеризованы методами элементного анализа, ^{13}C ЯМР-спектроскопии и эксклюзионной хроматографии (табл. 1.1).

Исследованные препараты значительно отличались по элементному составу и структурным характеристикам. Наибольшее содержание углерода и наименьшее кислорода было отмечено для ГК углей и торфов. Эти же препараты характеризовались самым высоким содержанием ароматических фрагментов. Максимальное содержание кислорода было отмечено для препаратов ГВ природных вод, минимальное – для ГВ торфов. Наименьшими молекулярными массами M_w характеризовались ГВ природных вод; наибольшими – торфов.

Табл. 1.1. Химическая характеристика использованных препаратов ГВ

Препараты ГВ	Атомные отношения			M_w	Распределение углерода, %			
	H/C	O/C	C/N		$C_{C=O}$	C_{COO}	C_{Ar}	C_{Alk}
Гуминовые вещества торфов								
PHF-T4H94	0.86	0.40	20	22.2	0.5	13.4	46.6	39.5
PHF-T7H98	0.87	0.48	53	18	3.6	12	35.5	48.9
PHF-TНН	0.87	0.51	36	16.8	1.3	15.5	46.8	36.4
PHF-TTL	0.83	0.52	24	19	2.4	17	45.6	35
PHA-T4H98	0.92	0.52	28		3.6	9.9	37.7	48.8
PHA-T5H98	0.93	0.50	27	28.1	2.3	12.8	38.9	46
PHA-Sk300	1.15	0.66	17		1.6	17.5	58.5	22.4
PFA-T4H98	0.86	0.57	127		1.1	12.1	26.5	60.3
PFA-T5H98	1.02	0.67	28		3	15.2	32.4	49.4
PFA-T7H98	1.00	0.60	75	9.8	2.2	11.8	34.9	51.1
PFA-T3L98	0.76	0.66	120		2.7	16.7	37.2	43.5
PFA-Sk00	0.88	0.74	27		2.6	15	48.6	33.8
PFA-Sk300	1.18	0.89	27		3.2	16.8	30.0	50.0
PDOM-TНН	0.67	1.18	29	6.7				
PDOM-TTL	0.67	1.27	52	5.5				
Гуминовые вещества почв								
SHA-Pw94	0.92	0.46	12	19	1	17	46	36
SHA-Pw96	1.10	0.46	14	19	4	19	34	43
SHA-Pw98	1.05	0.40	15		2.5	17.7	33.7	46.1
SHA-PwN	0.93	0.41	17		2	15	43	40
SHA-Pg94	1.00	0.45	14	22	1.1	15.2	45.6	38.1
SHA-Pg96	0.93	0.48	16		2	17	42	39
SHA-Pp94	1.09	0.60	13	21	1.9	15.6	43.8	38.7
SHA-Pp96	1.11	0.48	11	21	3	17	31	49
SHA-Gp94	1.06	0.63	12	22	2	15	46	37
SHA-Gw94	0.96	0.43	12	21	1	19	48	32
SHA-Cm94	0.66	0.34	14	21	1.5	14.3	56.8	27.4

Препараты ГВ	Атомные отношения			M_w	Распределение углерода, %			
	H/C	O/C	C/N		$C_{C=O}$	C_{COO}	C_{Ar}	C_{Alk}
SHA-CtV94	0.62	0.42	16	15	3	15	54	28
SHA-CtL00	0.79	0.35	14	16.3	3.3	15.7	52.0	29.0
SFA-Pg94	0.92	0.58	18	12.6				
SFA-Pg96	0.88	0.61	19		3.1	18	41.3	37.6
SFA-Pp94	1.06	0.57	12	10.0				
SFA-Pp96	0.91	0.54	11		2	23	26	49
SFA-Pw94	0.90	0.60	27	10.2				
SFA-Pw96	0.94	0.58	17	9.0	4	19.5	33.3	43.2
SFA-Pw98	0.84	0.63	40		3.4	19.8	33.1	43.7
SFA-Gw94	0.98	0.53	15	14				
SFA-CtL00	0.81	0.52	16		2.2	15.4	49.1	33.3
SDHF-Pg96	0.67	1.06	146	7.9				
SDHF-Pp96	0.71	1.14	283	7.2				
SDHF-Pw96	0.90	1.15	167	6.3				
Гуминовые вещества углей								
CHA-AGK	0.79	0.32	112	15.6	0.5	16.9	57.8	24.8
CHA-ALD	0.81	0.31	77	9.4	1	15	56	28
CHA-RO	0.78	0.43	55	16.4	2.9	17.7	65.9	13.5
CHA-Pow	0.93	0.41	53	9.4	3.1	15.2	57.3	24.4
CHA-GL02	0.72	0.25	23	9.9	2.8	13.9	59.5	23.8
CFA-GL02	0.89	0.37	35	31.0	5.8	19.8	42.8	31.5
CHR-GL02	0.76	0.31	26	9.2	2.3	12.3	52.4	33
CHM-GL02	0.82	0.50	15	20.5	2.6	17.1	51.5	28.8
CHM-Pow	0.82	0.49	15	5.7				
CHG-GL02	0.74	0.30	31		5.2	1.5	49.3	44
CHB-GL02	0.69	0.21	26		5.3	15.1	59	20.6
Гуминовые вещества природных вод								
AHF-RMX2	0.88	0.55	55	7.3	1.3	17.6	28.1	53.0
AHA-SR	0.98	0.59	51	12.9	5.0	17.0	28.0	51.0
AFA-SR	1.08	0.62	88	9.6	6.0	15.0	38.0	36.0
ADOM-SR	0.96	0.61	56		8	20.0	30.0	42.0
Гуминовые вещества донных отложений								
BHA-Sk00	0.42	1.1	17	17	1.6	7.1	36.0	55.2
BFA-Sk01	0.73	0.79	19	19				
Модифицированные гуминовые вещества								
Гидроксिलированные гуминовые вещества								
CHP-OFr	0.81	0.42	53		3.8	12.8	60.2	23.2
CHP-RFr	0.81	0.42	54		6.7	13.1	58	22.2
CHP-OEl	0.85	0.38	53		9.2	14.8	50.3	25.7
CHP-REl	0.89	0.38	52		8.4	14.5	53.4	23.7
CHP-OFe	1.18	0.37	52		6	16.1	55.3	22.6
CHP-RFe	0.85	0.38	53		6.7	16.1	53.3	23.9
Гидрохиноновые сополимеры гуминовых веществ								
CHP-HQ100	1.18	0.26	53	16.5	8.2	11.3	59.5	21
CHP-HQ250	1.15	0.34	54	14.0	6.1	8.1	56.6	29.2
CHP-HQ500	1.20	0.38	55	14.7	4.6	8.3	70.6	16.5
CHP-HBQ250-5%	0.85	0.36	53	9.0				
CHP-HBQ250-12%	0.89	0.35	54	7.8				

Препараты ГВ	Атомные отношения			M_w	Распределение углерода, %			
	H/C	O/C	C/N		$C_{C=O}$	C_{COO}	C_{Ar}	C_{Alk}
Пирокатехиновые сополимеры гуминовых веществ								
СНР-РС100	0.76	0.43	52	18.5	8.1	13.1	58.6	20.2
СНР-РС250	0.80	0.40	53	19.3	6.6	13.2	65.1	15.1
СНР-РС500	0.81	0.41	52	21.1	4.6	10.1	72.5	12.8
п-бензохиноновые сополимеры гуминовых веществ								
СНР-ВQ100	1.05	0.37	55	20.1	10.5	14.5	61	14
СНР-ВQ250	0.71	0.37	54	20.6	10.7	17.6	40.0	30.0
СНР-ВQ500	1.01	0.34	54	18.4	7.5	12.7	62.4	17.4
Сополимеры гуминовых веществ с фенолом								
СНР-РН-N100	0.41	0.77	54	9.6				
СНР-РН-N250	0.40	0.80	52	9.4	6	17	55	22
СНР-РН-HQ250	0.40	0.73	53	7.3	5	13	59	23
СНР-РН-РС250	0.38	0.77	51	8.2				
СНР-РН-HQ250-A	0.85	0.43	53		4	11	55	30
СНР-РН-РС250-A	0.86	0.45	53					
Сополимеры гуминовых веществ с салициловой кислотой								
СНР-СА250	0.79	0.44	53	10.1				
СНР-СА250G	0.80	0.44	53	9.7	5	16	54	25
СНР-СА250A	0.79	0.44	55	9.6	6.6	16.2	49.9	27.2
Сополимеры гуминовых веществ с 2,3-дигидроксibenзойной кислотой								
СНР-ДНВА250	0.77	0.39	52	9.8				
СНР-ДНВА250G	0.77	0.39	51	9.9	5.9	16.0	52.3	25.9
СНР-ДНВА250A	0.75	0.39	53	10.1				

Разнообразие свойств использованных в работе препаратов проиллюстрировано диаграммой ван Кревелена (рис. 1.2), отражающей распределение ГВ по степени их ненасыщенности (атомное отношение H/C) и обогащённости кислородом (атомное отношение O/C).

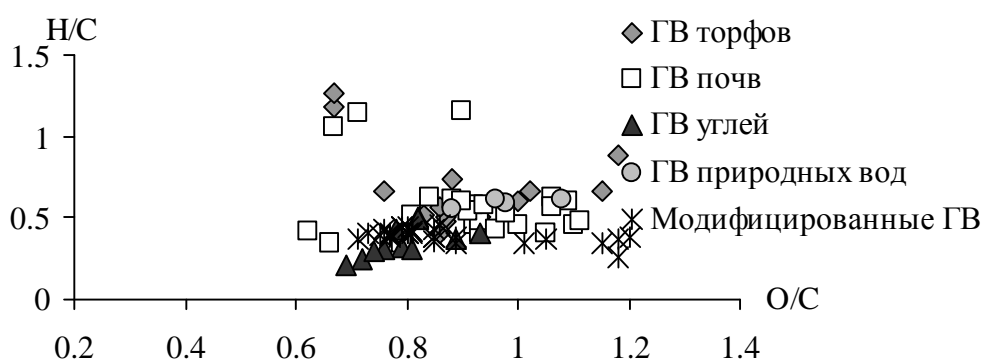


Рис. 1.2. Диаграмма ван Кревелена для исследованных в работе препаратов ГВ.

Как видно из представленных на рис.1.2 данных, ГВ, выделенные из углей и природных вод, характеризуются достаточно узкими диапазонами значений H/C и O/C и образуют достаточно хорошо обособленные группы. ГВ почв и торфов, напротив, образуют смешанную группу с широким разбросом этих показателей. В целом можно отметить, что использованные в работе ГВ характеризовались разбросом значений атомных отношений H/C и O/C 0.62-1.20 и 0.21-1.27 соответственно, что позволяет сделать вывод о представительности созданной выборки препаратов.

Глава 2. Исследование защитного действия ГВ методами биотестирования: метрологическая характеристика и количественное описание детоксифицирующих свойств

2.1. Метрологическая характеристика использованных методов биотестирования

Несмотря на высокий уровень существующих в настоящее время инструментальных методов, при проведении исследований, связанных с биологическими объектами, неизбежно применение биотестирования, позволяющего получать интегральную оценку воздействия на живые организмы различных факторов окружающей среды. При использовании методов биотестирования необходимо принимать во внимание нерешенную проблему достоверности получаемых результатов, связанную с неизбежной погрешностью метода и высокой гетерогенностью свойств, характерных для биологических объектов. Получение надёжных, научно обоснованных результатов было достигнуто правильным планированием структуры исследования. Одним из обязательных этапов является планирование объема выборки, позволяющего получать данные, отвечающие заданной точности. Выбор необходимого размера выборки n проводили как:

$$n = \frac{s_x^2 t_p^2 (1 + 1/2m)}{I_p^2} \quad (2.1)$$

где s – стандартное отклонение, t_p – коэффициент Стьюдента для вероятности P и объеме выборки в предварительных экспериментах m , I_p выбираемая экспериментатором максимальная разница между истинным и выборочным средним, выраженная в процентах. Для наших исследований необходимые объемы выборки рассчитывали для $I_p = 5$ и 10% и $P = 90, 95$ и 99% . Результаты расчётов для основных методов биотестирования, использованных в работе, приведены в табл. 2.1.

Табл. 2.1. Необходимые объемы выборки при проведении биотестирования использованными методами при различных значениях максимально допустимого отклонения среднего значения от истинного I_p и вероятности P

Тест-отклик	$I_p = 5\%$			$I_p = 10\%$		
	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$	$P = 99\%$	$P = 95\%$	$P = 90\%$
Биотестирование в водных средах						
<i>Метод проростков</i>						
Побеги	104±58	62±34	44±25	26±14	15±9	11±6
Корни	143±31	85±19	61±13	36±8	21±5	15±3
<i>Альгологическое биотестирование</i>						
F_v/F_m	12±3	8±2	5±2	2±1	2±1	2±1
Биотестирование в почвенных средах						
<i>Лабораторно-вегетационные эксперименты</i>						
Длина побегов	88±18	54±15	39±10	50±10	20±3	14±3
Масса побегов	90±12	58±10	40±10	54±9	23±5	17±4
<i>Полевые эксперименты</i>						
Масса побегов	1646±125	994±74	713±29	900±51	370±45	251±32

При проведении биотестирования в работе использовали объёмы выборок, рассчитанные для $I_p = 5\%$ при вероятности $P = 99\%$. Исключение составили полевые эксперименты, для которых рассчитанные необходимые объёмы выборки колебались

в пределах от 251 до 900 даже при $I_p = 10\%$. Поэтому определение объёма выборок при проведении полевых экспериментов осуществляли на основании производственных возможностей.

2.2. Количественное описание детоксифицирующих свойств ГВ

Защитное действие ГВ по отношению к живым организмам в присутствии токсикантов различных классов, т.е. явление детоксификации, ранее отмечалось многими исследователями. Тем не менее, большинство работ посвящено исключительно констатации наблюдаемого явления, в то время как проблема его количественной характеристики, направленная на поиск его взаимосвязи со структурными параметрами ГВ, их собственным действием на организмы и связующей способностью по отношению токсикантам практически не проводилась.

Для количественной оценки защитных свойств ГВ в присутствии токсикантов (обычно в данном случае используют термин «детоксифицирующих») нами был использован подход, основанный на использовании коэффициента детоксификации D и константы детоксификации K_{OC}^D , определяемых из данных токсикологических экспериментов. Достоинством коэффициента детоксификации D является то, что он отражает изменение уровня токсичности T в присутствии ГВ ($T_{T+ГВ}$) по сравнению с токсичностью T в их отсутствие (T_T), учитывая при этом возможное изменение тест-отклика под влиянием собственного воздействия ГВ. Принимая, что:

$$T_T = \frac{R_0 - R_T}{R_0} \quad (2.2)$$

и

$$T_{T+ГВ} = \frac{R_{ГВ} - R_{T+ГВ}}{R_{ГВ}} \quad (2.3)$$

где R_0 – тест-отклик в контроле (без токсиканта и ГВ); R_T – тест-отклик в присутствии Т; $R_{ГВ}$ – тест-отклик в присутствии ГВ; $R_{T+ГВ}$ – тест-отклик в присутствии токсиканта и ГВ, получаем:

$$D = \frac{T_T - T_{T+ГВ}}{T_T} = 1 - \frac{T_{T+ГВ}}{T_{ГВ}} \quad (2.4)$$

При условии, что чувствительность тест-организмов к собственному действию ГВ не изменяется в присутствии токсиканта, использование коэффициента D позволяет охарактеризовать детоксифицирующий эффект ГВ, обусловленный только связыванием токсиканта в нетоксичные комплексы, на фоне их стимулирующего воздействия на тест-объект. Поэтому, зная зависимость коэффициента D от концентрации ГВ (т.н. кривую детоксификации), можно рассчитать константу детоксификации K_{OC}^D . Преимущество данного параметра при оценке детоксификации по сравнению с коэффициентом D состоит в том, что если последний позволяет получить точечную оценку детоксификации, то K_{OC}^D является характеристикой детоксифицирующей способности ГВ во всем диапазоне концентраций. При этом его физический смысл аналогичен константам связывания, определяемым в химических экспериментах. Для вывода уравнения данной константы запишем уравнение связывания токсиканта ГВ:

$$T + ГВ \leftrightarrow T - ГВ \quad (2.5)$$

Долю токсиканта, находящегося в свободном состоянии α , можно выразить через соответствующую константу связывания:

$$\alpha = \frac{[T]}{[T] + [T - ГВ]} = \frac{1}{1 + C_{ГВ} \times K_{OC}} \quad (2.6)$$

В условиях, когда токсичность раствора прямо пропорциональна концентрации токсиканта, токсичность в его присутствии будет выражаться следующим образом:

$$T_T = k \times C_T \quad (2.7)$$

где k – коэффициент пропорциональности.

Токсичность токсиканта в присутствии ГВ аналогично можно записать как:

$$T_{T+ГВ} = k \times [T] \quad (2.8)$$

Подставляя (2.7) и (2.8) в уравнение (2.4), получаем:

$$D = 1 - \frac{[T]}{C_T} = 1 - \alpha \quad (2.9)$$

Выражая долю несвязанного токсиканта α через концентрацию ГВ на основании зависимости K_{OC} от α (2.6), получаем:

$$D = \frac{K_{OC}^D \times C_{ГВ}}{1 + K_{OC}^D \times C_{ГВ}} \quad (2.10)$$

Фигурирующую в данном уравнении константу, определяемую видом зависимости эффекта детоксикации от концентрации ГВ, мы назвали константой детоксификации – K_{OC}^D . Она будет эквивалентна константе химического связывания в случае, если величина эффекта детоксикации D зависит только от концентрации свободной формы токсиканта. На практике K_{OC}^D можно рассчитать путем аппроксимации экспериментальных зависимостей D от концентрации ГВ уравнением (2.10). Поэтому результаты всех токсикологических экспериментов представляли в виде соответствующих кривых детоксификации.

Глава 3. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса

3.1. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса в водной среде

В качестве модельного гербицида для создания гербицидного стресса использовали атразин – представитель класса сим-триазиновых гербицидов, ингибиторов фотосинтеза. Выбор был обусловлен высокой устойчивостью этого гербицида в окружающей среде.

Изучение связывающей способности ГВ по отношению к гербициду показало, что диапазон изменения констант связывания атразина ГВ составил 110–575 л/кг ОС (табл. 3.1), что хорошо согласуется результатами предыдущих исследователей и свидетельствует о незначительном взаимодействии атразина с ГВ.

Табл. 3.1. Константы связывания K_{OC} атразина ГВ различного происхождения

Препарат	K_{OC} , л/кг ОС	Препарат	K_{OC} , л/кг ОС
ОВ водного экстракта торфа		ГК дерново-подзолистых почв	
PDOM-ТНН	87±5	SHA-Pw94	380±20
	ФК почв	SHA-Pp94	400±24
SFA-Pw96	192±12	SHA-Pw96	281±17
SFA-Pp96	110±10	SHA-Pp96	181±30
SFA-Pg96	275±17	SHA-Pg96	380±23
Сумма ГК и ФК торфов		ГК серых лесных почв и черноземов	
РНА-НТО	300±20	SHA-Gw94	575±34
РНФ-Т498	377±	SHA-Cm94	404±23
	ГК бурого угля	SHA-CtV94	501±31
СНА-AGK	575±35	SHA-PwN	444±25

Полученные значения K_{OC} использовали для выявления взаимосвязи между связывающей способностью и структурой ГВ (табл. 3.1 и 1.1). Корреляционный анализ показал наличие связи K_{OC} с C_{Ar} и C_{Ar}/C_{Alk} – параметрами, характеризующими степень ароматичности ГВ. Коэффициенты корреляции r для пар переменных « $C_{Ar} - K_{OC}$ » и « $C_{Ar}/C_{Alk} - K_{OC}$ » составили 0.91 и 0.87. Наличие данной взаимосвязи подтверждает важную роль ароматических фрагментов ГВ в процессе взаимодействия с атразином. Коэффициент корреляции между M_w препаратов ГВ и K_{OC} составил 0.73. Это может свидетельствовать о преимущественном связывании атразина с высокомолекулярными фракциями ГВ.

Для исследования детоксицирующей способности ГВ по отношению к атразину в водной среде были выбраны препараты ГВ торфов (РНФ-ТТЛ, РНФ-ТНН) и ОВ водных экстрактов этих же торфов (PDOM-ТТЛ, PDOM-ТНН), что было обусловлено максимальными различиями в свойствах данных препаратов. При биотестировании в качестве тест-объекта использовали растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., а в качестве тест-отклика – интенсивность фотосинтеза растений, которую оценивали по отношению Y_{100}/Y_n замедленной флуоресценции (ЗФ), характеризующему скорость транспорта электронов, где Y_{100} – интенсивность ЗФ при интенсивности возбуждающего света 100%, Y_n – интенсивность ЗФ при интенсивности возбуждающего света $n\%$.

Проведенные эксперименты показали, что внесение ГВ и ОВ водных экстрактов торфов в биотестируемую систему способствовало снижению токсичности атразина во всех исследованных концентрациях. Однако наблюдаемые эффекты были невелики: значение коэффициента D варьировалось в пределах 0.2-0.6, т.е. полного снятия токсичности не наблюдали. Значения констант связывания K_{OC}^D , рассчитанные на основании полученных данных согласно уравнению (2.10), приведены в табл. 3.2.

Табл. 3.2. Эффективные константы связывания K_{OC}^D атразина ГВ в водной среде

Препарат ГВ	K_{OC}^D , л/кг ОС
PDOM-ТНН	918±15
PDOM-ТТЛ	957±26
РНФ-ТНН	632±31
РНФ-ТТЛ	440±19

Как видно из табл. 3.2, значения K_{OC}^D в 2-10 раз превышали значения K_{OC} (табл. 3.1), причем для препаратов ОВ водного экстракта торфа это различие было более выражено, чем для препаратов ГВ. Кроме того, значения K_{OC}^D возрастали при уменьшении M_w препаратов ГВ, в то время как для значений K_{OC} была отмечена обратная тенденция. Таким образом, несмотря на близкие значения, константы взаимодействия K_{OC} и K_{OC}^D по-разному зависели от свойств ГВ, т.е. детоксификация и связывание атразина определялись различными процессами. Подтверждением этому является также установленная взаимосвязь для пар переменных « $O/C - K_{OC}^D$ » и « $H/C - K_{OC}^D$ », коэффициент корреляции для которых составил 0.94 и 0.96, соответственно, в то время как для K_{OC} подобной взаимосвязи отмечено не было.

На основании полученных данных можно высказать предположение, что связывание атразина ГВ не является основным фактором, определяющим детоксификацию атразина. Для установления причины детоксификации атразина ГВ необходимо было провести дополнительные эксперименты, при этом в качестве тест-объектов следовало выбрать более простую, чем целый организм, систему. Поэтому для оценки защитного действия ГВ в качестве тест-объекта была использована одноклеточная водоросль *Chlorella pyrenoidosa*. Тест-откликом служили показатели F_i/F_m и F_v/F_m кривой индукции флуоресценции, характеризующие фотосинтетическую активность водоросли. При этом первый показатель зависит только от концентрации специфических ингибиторов фотосинтеза (т.е. атразина), а изменение отношения F_v/F_m может происходить вследствие широкого ряда причин и характеризует состояние водоросли в целом. Так как ГВ обладают собственной флуоресценцией, а их присутствие существенно сказывается на величинах F_v/F_m , предварительно были проведены эксперименты, направленная на оценку мешающего влияния ГВ. На основании полученных данных был предложен способ расчёта показателей F_i/F_m и F_v/F_m кривой индукции флуоресценции с учётом собственной флуоресценции ГВ.

Согласно нашим первоначальным предположениям, связывание атразина ГВ должно было привести к снижению концентрации свободного гербицида и, как следствие, уменьшению токсичности атразина. Для проверки этой гипотезы первоначально регистрацию токсичности атразина проводили сразу после внесения предварительно приготовленной смеси атразина с ГВ. Время взаимодействия ГВ и атразина составляло от 1 ч до 7 с. Было установлено, что присутствие ГВ не влияло на показатель F_i/F_m , т.е. взаимодействие атразина с ГВ в условиях эксперимента крайне незначительно или отсутствует.

В связи с тем, что детоксификация в присутствии ГВ может быть обусловлена не только связыванием токсиканта, но также их собственным действием на организмы, то необходимо было провести эксперименты с ненулевой экспозицией. Проведение таких экспериментов позволило регистрировать «суммарную» детоксификацию атразина в присутствии ГВ, обусловленную вышеупомянутыми причинами. В качестве тест-отклика использовали показатель F_v/F_m . Было установлено, что внесение ГВ приводило к снижению токсичности атразина (рис. 3.1). В большинстве случаев кривые детоксификации имели S-образную форму с выходом на плато при концентрации ГВ 30 мг/л. Исключение составили препараты водных экстрактов из

торфа PDOM-ТНН и PDOM-ТТЛ, для которых наблюдали линейную зависимость D от концентрации ГВ.

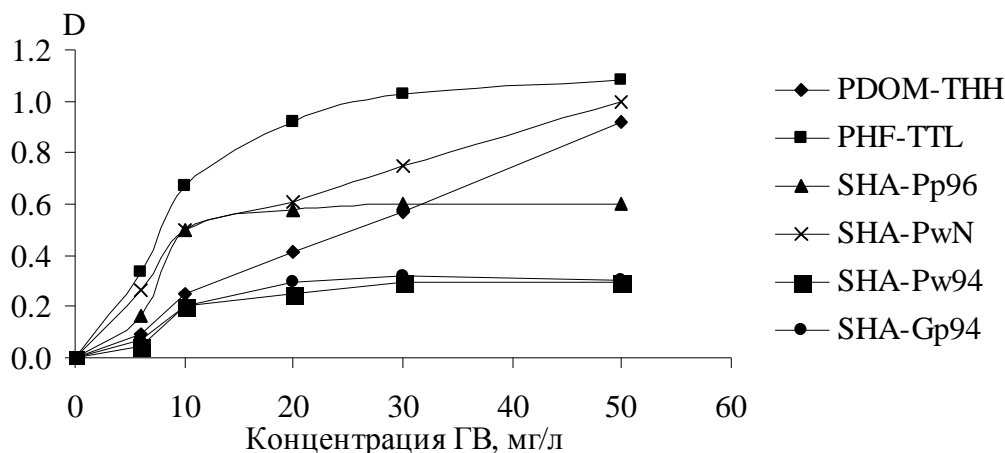


Рис. 3.1. Кривые детоксикации атразина ГВ различного происхождения.

Рассчитанные значения K_{OC}^D атразина ГВ (табл. 3.3) варьировались в пределах $5.0 \times 10^4 - 1.9 \times 10^6$ л/кг ОС, превышая на 2 порядка аналогичные величины, полученные в экспериментах с растениями. ГВ водных вытяжек почв обладали наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к атразину. Близкими к ним значениями K_{OC}^D характеризовались ГК угля и чернозема. Препараты ФК почв практически не снижали токсичность атразина.

Сравнение K_{OC} и K_{OC}^D (табл. 3.1) показало, что K_{OC}^D в среднем на два-три порядка превышали K_{OC} , при этом коэффициент корреляции между ними составлял 0.12. Кроме того, для K_{OC} наиболее тесную корреляцию наблюдали с содержанием C_{Ar} в ГВ, тогда как для K_{OC}^D такая взаимосвязь отсутствовала. Найденная закономерность увеличения защитного действия ГВ при переходе от использования в качестве тест-объекта многоклеточного организма (растения) к одноклеточному (водоросли) позволяет предположить наличие взаимосвязи между защитными свойствами ГВ и их поглощением тест-организмами. Действительно, для K_{OC}^D нами была установлена значимая взаимосвязь с содержанием низкомолекулярной фракции <5 КДа – предела проницаемости клеточных мембран ($r = 0.93$). Установленные закономерности свидетельствует о том, что связывание и детоксикация атразина ГВ в водной среде определяются различными процессами, а ведущую роль в проявлении защитных свойств ГВ по отношению к растениям в данном случае играет собственная физиологическая активность ГВ. Однако, как показали проведенные эксперименты, в выбранных нами условиях ГВ в целом не обладали стимулирующим действием по отношению к культуре водоросли (рис. 3.2.).

Табл. 3.3. Эффективные константы связывания K_{OC}^D атразина ГВ в водной среде. Тест-культура *Chlorella pyrenoidosa*

Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС	Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС
Сумма ГК и ФК природных вод		ГК почв	
AHF-RMX2	2.9×10^5	ГК дерново-подзолистых почв	
PDOM-TH	5.8×10^5	SHA-Pw94	1.2×10^5
PDOM-TL	4.5×10^5	SHA-Pp94	1.4×10^5
SDHF-Pw96	2.1×10^6	SHA-Pg94	1.0×10^4
SDHF-Pp96	1.8×10^6	SHA-Pw96	5.6×10^5
SDHF-Pg96	1.9×10^6	SHA-Pp96	5.5×10^5
	ФК почв	SHA-Pg96	5.6×10^5
SFA-Pg94	1.4×10^5	ГК серых лесных почв	
SFA-Gw94	5.3×10^5	SHA-Gw94	2.0×10^5
SFA-Pw96	5.0×10^4	SHA-Gp94	1.4×10^5
SFA-Pp96	5.0×10^4	ГК черноземов	
SFA-Pg96	6.0×10^4	SHA-Cm94	2.9×10^5
	Сумма ГК и ФК торфов	SHA-CtV94	3.7×10^5
PHF-TНН	5.7×10^5	SHA-PwN	7.1×10^5
PHF-TTL	1.3×10^6	ГК бурого угля	
PHF-T498	8.9×10^5	CHA-AGK	7.4×10^5

Погрешность определения K_{OC}^D составила 15%

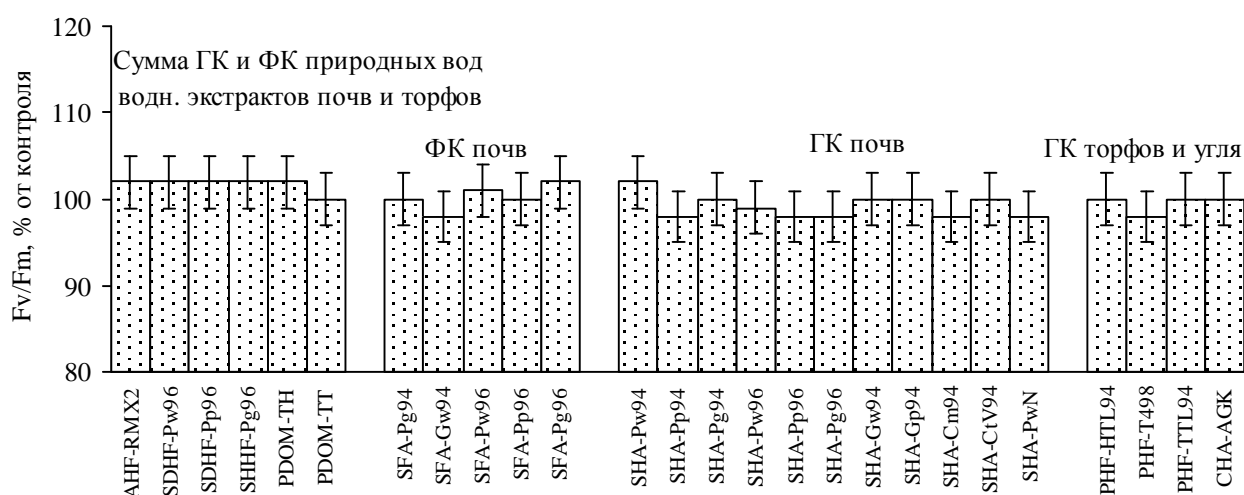


Рис. 3.2. Влияние ГВ на фотосинтетическую активность *Ch. pyrenoidosa*. Концентрация ГВ 50 мг/л. Время экспозиции 3 ч.

Можно предположить, что стимулирующая активность ГВ проявляется только в стрессовых для организмов условиях. Действительно, в ряде экспериментов нами было отмечено значительное увеличение фотосинтетической активности хлореллы при внесении ГВ. При этом обязательным условием проявления стимулирующего действия ГВ являлось негативное изменение условий культивирования (например, снижение температуры) (рис. 3.3). Наиболее выраженное защитное действие было отмечено для препаратов ГВ, характеризующихся высоким содержанием кремния.

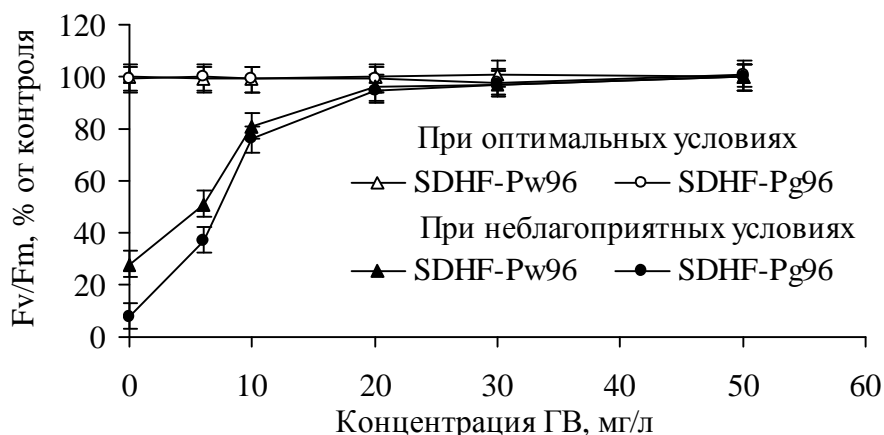


Рис. 3.3. Влияние ГВ на фотосинтетическую активность *Ch. pyrenoidosa* при оптимальных (37°C) и неблагоприятных (25°C) условиях.

Полученные результаты свидетельствуют о зависимости физиологической активности ГВ от внешних условий, описанную ранее другими исследователями. Таким образом, наблюдаемую детоксификацию атразина ГВ в водной среде следует объяснять действием ГВ на тест-организмы, а не связыванием атразина в нетоксичные комплексы.

3.2. Защитное действие ГВ в условиях гербицидного стресса в почвенной среде

Для изучения связывающей способности ГВ по отношению к атразину была создана выборка образцов из 3 почв различных почвенно-географических зон. Она включала в себя образцы дерново-подзолистой, серой лесной почвы и чернозёма. В связи с тем, что на адсорбционно-десорбционное поведение атразина могут оказывать влияние также и почвенные ферменты, часть экспериментов была проведена в присутствии лакказы – широко распространённой в почве оксидоредуктазы, уникальной особенностью которой является широкая субстратная специфичность, высокая термо- и рН-стабильность и высокая активность в почве в течение круглого года. Целью проведения экспериментов в присутствии лакказы являлась оценка возможности взаимодействия атразина с ГВ по механизму окислительного связывания, приводящего к необратимому включению гербицида в структуру ГВ с образованием ковалентных связей. Возможность детоксификации ксенобиотиков по указанному механизму в настоящее время показана для веществ фенольной и аминной природы, но не изучена для атразина, в отношении которого существуют лишь отдельные противоречивые данные. Адсорбционно-десорбционное поведение атразина в присутствии лакказы изучали с использованием фермента из базидиомицета *Coriolus hirsutus*.

На основании полученных данных строили изотермы адсорбции атразина (рис. 3.4) и рассчитывали коэффициент распределения K_d , который в данных условиях эквивалентен константе адсорбции. При расчете константы связывания атразина с органическим веществом K_{OC} проводили нормирование K_d на содержание OC в почве (табл. 3.4).

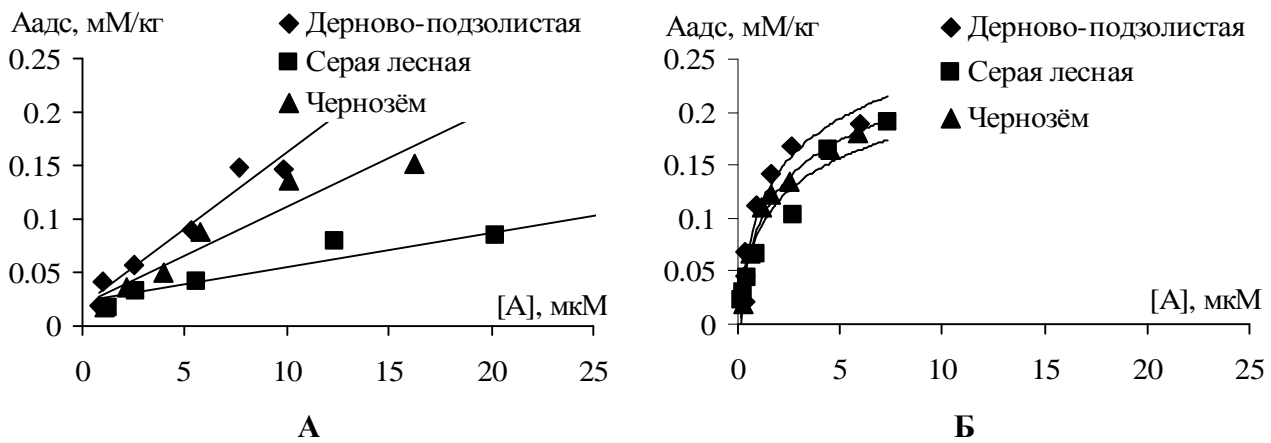


Рис. 3.4. Изотермы сорбции атразина различными почвами в отсутствие (А) и присутствии лакказы (Б).

Табл. 3.4. Коэффициенты распределения K_d и константы связывания K_{OC} атразина исследованными почвами

Почва	K_d	K_{OC} , л/кг ОС
Дерново-подзолистая	14.3±0.2	379
Серая лесная	3.2±0.1	159
Чернозём	9.2±0.2	159

Константы распределения атразина в исследованных почвах изменялись от 3.2 до 14.3 л/кг ОС, что хорошо согласуется с данными предыдущих исследователей. Максимальное значение этого показателя было зафиксировано для чернозёма, что связано с самым высоким содержанием ОС в этой почве. Полученные значения констант связывания K_{OC} варьировались в пределах 159-379 л/кг ОС и в целом были близки к ранее полученным константам связывания для ГВ в водной среде (табл. 3.1). Существенное различие величин K_{OC} для дерново-подзолистой и остальных почв указывает на то, что связывание атразина определяется не только содержанием ОС в почве, но также и структурными особенностями почвенных ГВ.

Анализ изотерм сорбции в присутствии лакказы (рис. 3.4Б) показал, что внесение фермента приводит к выраженным изменениям процесса сорбции. Вместо линейных изотерм, полученных при изучении связывания атразина почвами без внесения фермента, в начале наблюдали резкое увеличение количества адсорбированного атразина при росте его равновесной концентрации, которое затем сменялось снижением интенсивности адсорбции. Сложный характер адсорбционных изотерм в данном случае свидетельствует о наличии различных механизмов связывания гербицида почвами. При этом наблюдали значимое увеличение параметров, характеризующих связывание гербицида почвой (табл. 3.5).

Табл. 3.5. Коэффициенты распределения K_d и константы связывания K_{OC} атразина исследованными почвами в присутствии лакказы

Почва	K_d , л/кг	K_{OC} , л/кг ОС
Дерново-подзолистая	25.9±0.3	687
Серая лесная	25.1±0.3	1249
Чернозём	23.8±0.2	411

В присутствии лакказы константы связывания атразина возросли до 411-1249 л/кг ОС, превышая аналогичные значения без фермента в 1.8-8 раз.

Исследование, направленное на изучение взаимодействия атразина с лакказой показало, что сама лакказа не оказывала влияния на деградацию или сорбционное поведение атразина. Поэтому на основании полученных результатов можно сделать вывод об увеличении связывающей способности почвенного органического вещества в присутствии этого фермента. По аналогии с другими ксенобиотиками можно предположить дополнительное включение атразина по механизму окислительного связывания, являющееся каталитически инициированным ковалентным связыванием ксенобиотиков. В связи с тем, что в результате протекания реакции окислительного связывания ксенобиотик должен включаться в структуру органического вещества необратимо, для проверки предположения о связывании атразина по указанному механизму нами были проведены эксперименты по десорбции атразина. Для численной описания изотермы аппроксимировали уравнением Фрейндлиха, а описание гистерезиса проводили с использованием коэффициента гистерезиса H , представляющего собой отношение степенных коэффициентов изотерм адсорбции n_F и десорбции n_{Fd} в уравнении Фрейндлиха (табл. 3.6).

Табл. 3.6. Параметры уравнения Фрейндлиха и коэффициенты гистерезиса адсорбционно-десорбционных изотерм атразина исследованными почвами в присутствии и отсутствие лакказы

Почва	Адсорбция		Десорбция		H
	K_F	n_F	K_F	n_{Fd}	
<i>В отсутствие лакказы</i>					
Дерново-подзолистая	4.50±0.20	0.72±0.03	0.57±0.03	0.27±0.02	2.7±0.1
Серая лесная	0.81±0.04	0.56±0.03	1.68±0.08	0.52±0.03	1.1±0.1
Чернозём	5.55±0.30	0.83±0.04	0.36±0.02	0.23±0.01	3.6±0.2
<i>В присутствии лакказы</i>					
Дерново-подзолистая	5.80±0.29	0.60±0.03	0.36±0.02	0.130±0.007	4.6±0.2
Серая лесная	3.13±0.15	0.56±0.03	0.20±0.01	0.029±0.001	19.3±0.9
Чернозём	6.79±0.34	0.66±0.03	0.22±0.01	0.060±0.003	11.0±0.5

Константы адсорбции Фрейндлиха K_F для изученных почв в вариантах без лакказы варьировались в диапазоне 0.81-5.55, что хорошо согласуется с данными других авторов. Как и при аппроксимации данных линейной зависимостью (расчёт Kd), внесение лакказы приводило к резкому увеличению адсорбции атразина: K_F возрастали до 3.13-6.79, значительно превышая аналогичные значения без лакказы.

Как показывают данные табл. 3.6, связывание атразина почвами характеризовалось значительным гистерезисом. Однако внесение лакказы во всех случаях способствовало резкому снижению количества десорбированного атразина. Величины гистерезиса для исследованных почв составили 4.6-19.3, что превышало значения H для адсорбции-десорбции без фермента в 2-18 раз.

Основываясь на проведенных экспериментах можно сделать вывод, что внесение лакказы *S. hirsutus* способствует увеличению связывающей способности почв по отношению к атразину. При этом в присутствии фермента связывание атразина почвами происходит, вероятно, по механизму окислительного связывания, о чём свидетельствует анализ характера изотерм адсорбции и десорбции, а также увеличение количества необратимо связанного гербицида. Высказанную гипотезу подтверждает также тот факт, что в ходе проведения экспериментов нами не было

установлено образование метаболитов атразина, т.е. отсутствовали процессы разложения гербицида, которые также могли привести к необратимому выведению атразина из среды. Принимая во внимание тот факт, что токсичностью обладает лишь несвязанная форма гербицида, можно сделать вывод о том, что присутствие лакказы в почве способствует детоксификации атразина в окружающей среде. Полученные данные могут быть использованы для разработки биотехнологических подходов при детоксификации почв, загрязнённых атразином и другими гербицидами сим-триазинового ряда.

Как уже говорилось выше, связывающая способность почв по отношению к атразину определяется не только общим содержанием органического вещества, но также и структурными особенностями входящих в его состав ГВ. Для исследования зависимости связывания атразина почвами от свойств ГВ были проведены эксперименты с использованием 11 модельных комплексов ГВ с каолинитом. Выбор каолинита в качестве минеральной подложки был обусловлен тем, что данный представитель группы глинистых алюмосиликатов широко представлен в илистых и коллоидных фракциях всех почв и представляет собой слоистый силикат с нерасширяющейся кристаллической решёткой, что позволило минимизировать влияние на процессы адсорбции свойств самого минерала.

В связи с низким содержанием ГВ (менее 1%) в полученных комплексах (табл. 3.7) для расчёта констант связывания использовали подход, позволяющий учитывать взаимодействие с минеральной фазой адсорбента. Для этого принимали, что наблюдаемый коэффициент распределения зависит от связывающей способности минерала, ГВ, а также их относительного содержания в комплексе:

$$K_d = f_m \cdot K_m + f_{OC} \cdot K_{OC} \quad (3.1)$$

где K_m – константа связывания с минералом, f_{OC} – доля ГВ в составе комплекса каолинит-ГВ, f_m рассчитывали как $1 - f_{OC}$. При этом считали, что K_m равна величине K_d исходного каолинита. Характеристику обратимости адсорбции проводили аналогично экспериментам по изучению связывания атразина почвами.

Результаты проведённых экспериментов приведены в табл. 3.7. Там же для сравнения приведены значения констант связывания с ГВ в водной среде.

Табл. 3.7. Содержание *OC* и характеристика адсорбции-десорбции атразина модельными комплексами каолинита с ГВ различного происхождения

Сорбент	<i>OC</i> , кг/кг	K_d , л/кг	K_{OC} , л/кг <i>OC</i>	K_{OC} (раствор), л/кг <i>OC</i>	<i>H</i>
каолинит	–	1.72±0.09	–	–	1.21
АНА-SHo13	0.229±0.003	2.08±0.09	157	–	9.24
SFA-Pw96	0.165±0.008	1.93±0.09	128	192±12	5.90
SFA-Pg96	0.166±0.009	1.94±0.09	137	275±17	8.30
SHA-Pw94	0.249±0.008	2.20±0.09	194	380±12	7.17
SHA-Pw96	0.264±0.008	2.09±0.07	143	281±17	5.73
SHA-CtV94	0.245±0.009	2.17±0.08	184	501±31	5.93
SHA-Cm94	0.248±0.006	2.17±0.09	184	404±23	7.76
РНА-НТО	0.274±0.009	2.20±0.07	178	300±10	2.31
РНА-Н8	0.286±0.009	2.06±0.06	121	–	3.19
СНА-АГК	0.237±0.005	2.28±0.09	238	575±35	7.18
РНА-РНА	0.240±0.004	2.48±0.09	319	–	5.40

Как показывают данные табл. 3.7, несмотря на относительно невысокое содержание ГВ в модельных комплексах, величины коэффициентов распределения в присутствии ГВ возрастали с 1.72 до 1.93-2.48 л/кг. При этом значения констант связывания атразина ГВ в составе органоминеральных комплексов были в среднем в полтора-два раза меньше, чем аналогичные величины для ГВ в водной среде. Это свидетельствует о меньшей доступности мест связывания для атразина в ГВ, адсорбированных на каолините. Величины коэффициента гистерезиса H (табл. 3.7) изменялись от 2.31 до 9.24, значительно превышая единицу, что свидетельствует о частичной обратимости адсорбции атразина.

При статистическом анализе данных была обнаружена положительная корреляционная взаимосвязь между K_{OC} и параметрами, характеризующим гидрофобность ГВ SC_{Ar}/C_{Alk-O} и $C_{Ar-H,C}$ ($r = 0.90$ и 0.76). Аналогичная взаимосвязь ранее нами была отмечена для пары $K_{OC} - C_{Ar-H,C}$ ($r = 0.95$) при исследовании взаимодействия ГВ с атразином в водной среде. Это указывает на гидрофобное взаимодействие как ведущий механизм связывания атразина ГВ в водных и почвенных средах.

Исследование детоксицирующей способности ГВ по отношению к атразину в почве проводили методом лабораторных вегетационных экспериментов на образцах дерново-подзолистых почв. Тест-объектом служили растения пшеницы, откликом – сырая надземная биомасса.

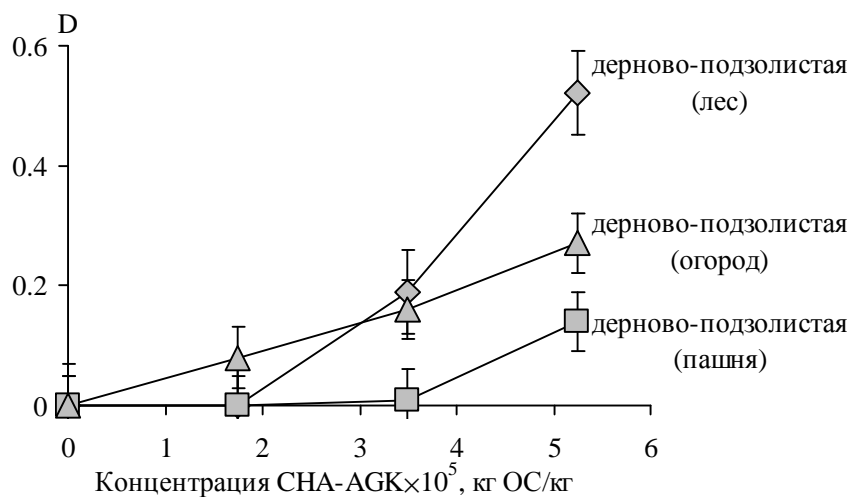


Рис. 3.5. Детоксицирующая способность препарата ГК угля СНА-АГК по отношению к атразину в условиях вегетационного эксперимента на различных почвах.

Препарат ГК угля СНА-АГК проявил различную детоксицирующую способность по отношению к атразину на исследованных почвах (рис. 3.5), что связано с неодинаковой эффективностью гербицида на почвах. Так, внесение атразина в варианте дерново-подзолистой почвы под лесом вызывало 25% снижение биомассы, для пахотной и огородной почв эти величины составили 93% и 80% соответственно. При этом на исследованных почвах биомасса пшеницы в варианте с внесением атразина и СНА-АГК в максимальной дозе составляла $150 \pm 6\%$ от варианта с внесением атразина. Рассчитанные константы K_{OC}^D составили 2.1×10^4 ;

0.3×10^4 и 0.7×10^4 л/кг ОС для дерново-подзолистой почвы под лесом, пашней и огородом соответственно и были близки к полученным при изучении сорбции атразина ГВ, адсорбированными на каолините и почвами. Это свидетельствует о том, что в почвенных средах основным фактором, определяющим детоксификацию атразина ГВ, является связывание гербицида, в то время как вклад собственного стимулирующего действия ГВ по отношению к растениям незначителен. Принимая во внимание близость констант связывания K_{OC} , найденных для ГВ в водных и почвенных средах, можно сделать вывод о том, что защитное действие ГВ в водных средах значительно превышает таковое в почвенных средах, что связано, по-видимому, с более низкой доступностью ГВ для растений.

Глава 4. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами

4.1. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжёлыми металлами, в водной среде

В качестве модельного тяжёлого металла (ТМ) использовали медь. В связи с тем, что в настоящее время взаимодействие меди с ГВ достаточно хорошо изучено и многочисленными работами показано, что связывание меди ГВ происходит через кислородсодержащие функциональные группы, для проведения исследований использовали препараты модифицированных ГВ с искусственно введенными бензохиноновыми, пирокатехиновыми, гидрохиноновыми и фенольными фрагментами (табл. 1.1), которые, как мы ожидали, должны были обладать повышенной связывающей способностью по отношению к меди. Исследование защитного действия ГВ проводили с помощью биотестирования по методу проростков с использованием пшеницы.

Результаты биотестирования показали, что внесение гуминовых препаратов приводило к снижению токсичности меди уже при концентрации 5 мг/л, а при концентрациях 30 мг/л и выше наблюдали полное снятие негативного действия меди (рис. 4.1). Особо следует подчеркнуть, что при концентрациях ГВ 30 мг/л и выше длина корней в присутствии ГВ превышала даже контрольные значения для проростков, проращиваемых на дистиллированной воде без внесения меди.

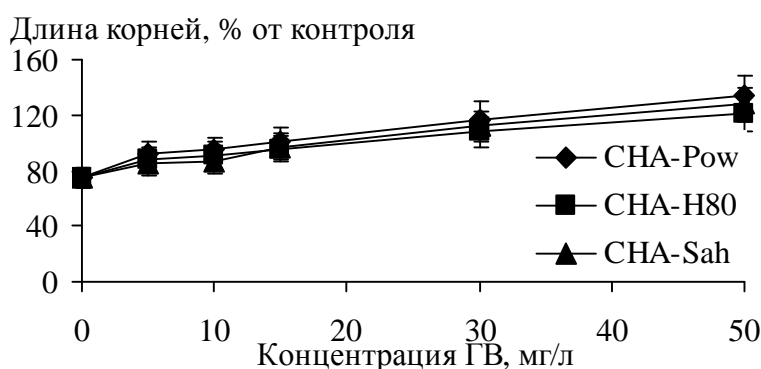


Рис. 4.1. Влияние различных ГК угля на длину корней проростков мягкой пшеницы *T. aestivum* в присутствии Cu(II).

Защитное действие ГВ, искусственно обогащённых кислородсодержащими функциональными группами, практически во всех случаях было более ярко выражено, чем для исходного препарата ГК (рис. 4.2, табл. 4.1). Это свидетельствует об определяющей роли введённых функциональных групп в реализации детоксицирующей способности ГВ в присутствии к меди.

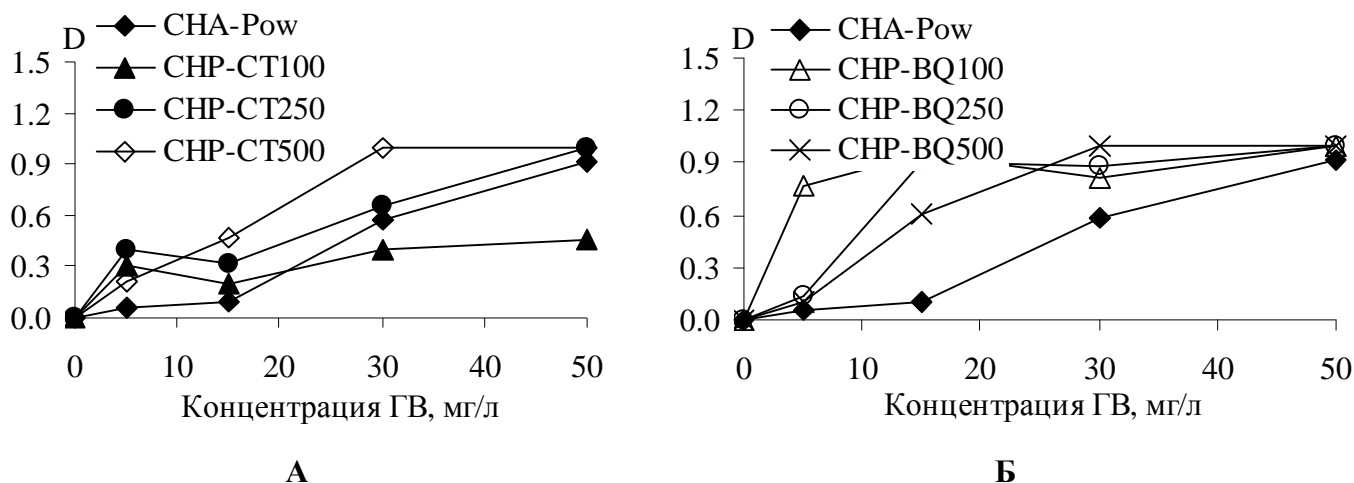


Рис. 4.2. Кривые детоксификации меди ГВ на примере пирокатехин-формальдегидных сополимеров (А) и сополимеров с п-бензохиноном (Б).

Табл. 4.1. Эффективные константы связывания K_{OC}^D меди ГК угля и их производными

Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС	Препарат	K_{OC}^D , л/кг ОС
Нативные ГВ		Пирокатехиновые сополимеры ГВ	
CHA-Pow	5.2×10^4	CHP-CT100	4.0×10^4
CHA-H80	1.5×10^5	CHP-CT250	6.5×10^5
CHA-Sah	6.0×10^4	CHP-CT500	7.0×10^4
Гидроксильированные ГВ		Сополимеры ГВ с фенолом	
CHP-OFr	3.5×10^5	CHP-PH-N100	1.0×10^5
CHP-OEl	2.1×10^5	CHP-PH-N250	1.2×10^5
CHP-OFe	2.5×10^5	CHP-PH-HQ250	3.5×10^5
CHP-RFr	1.5×10^5	CHP-PH-HQ250A	4.1×10^5
CHP-REl	2.0×10^5	CHP-PH-PC250	5.1×10^5
CHP-RFe	3.0×10^5	CHP-PH-PC250A	6.8×10^5
Сополимеры с салициловой кислотой		п-бензохиноновые сополимеры ГВ	
CHP-SA250	6.6×10^5	CHP-BQ100	7.0×10^5
CHP-SA250G	1.9×10^5	CHP-BQ250	2.0×10^5
CHP-SA250A	1.1×10^6	CHP-BQ500	2.5×10^5
Сополимеры с 2,3-дигидроксибензойной кислотой		Гидрохиноновые сополимеры ГВ	
CHP-DHBA250	1.4×10^5	CHP-HQ100	1.6×10^4
CHP-DHBA250G	1.4×10^5	CHP-HQ250	9.5×10^4
CHP-DHBA250A	4.3×10^5	CHP-HQ500	5.9×10^4
		CHP-HVQ250-5%	8.0×10^5
		CHP-HVQ250-12%	10.0×10^5

Погрешность определения K_{OC}^D составила 15%

Значения K_{oc}^D для природных ГВ варьировались в диапазоне 6.0×10^4 – 1.5×10^5 л/кг ОС, что незначительно превышает обычно приводимые в литературе данные по константам связывания меди ГВ (6.3×10^3 – 3.2×10^4 л/кг ОС). Это позволяет утверждать, что в водной среде защитные свойства ГВ по отношению к растениям в присутствии меди обусловлены, главным образом, связыванием металла в недоступные комплексы.

4.2. Защитное действие ГВ в условиях стресса, вызываемого тяжелыми металлами, в почвенной среде

Защитное действие ГВ в присутствии ТМ в почвенной среде изучали в условиях полевых экспериментов с использованием пшеницы в качестве тест-объекта. Исследованные препараты включали ГК угля СНА-Pow и их гидрохиноновые сополимеры СНР-НВQ250-5%, и СНР-НВQ250-12%, характеризовавшиеся наибольшей величиной защитного действия в водной среде (табл. 4.1). Опыты проводили в Московской обл. (среднее количество осадков 650-700 мм, средняя зимняя и летняя температуры -7 и $+19^\circ\text{C}$) на дерново-подзолистой почве (средний суглинок, рН 5.6, содержание гумуса 3%).

Полученные результаты показали, что, ГВ проявляют выраженное защитное действие в присутствии меди (рис. 4.2Б). При этом, как и в случае экспериментов в водной среде, в отсутствие стресса, вызываемого токсикантом, ГВ и их производные не обладали выраженной стимулирующей активностью (рис. 4.2А).

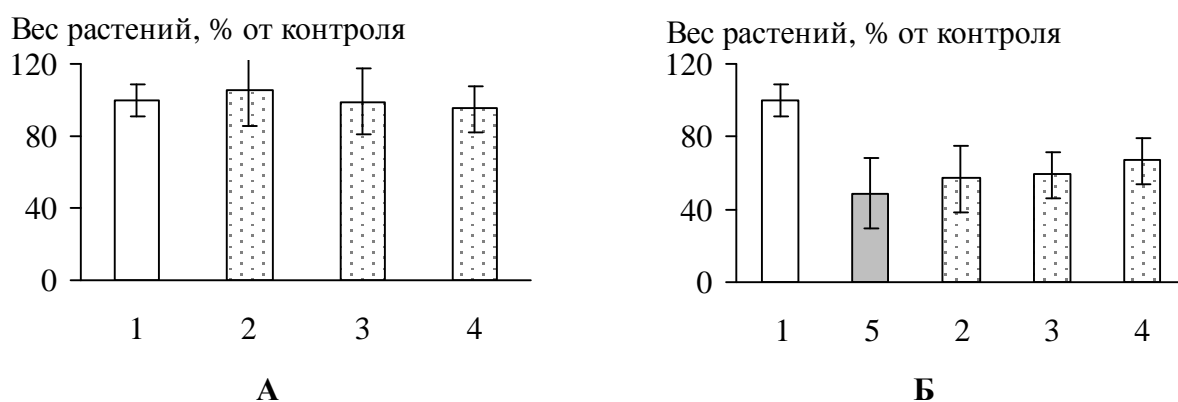


Рис. 4.2. Влияние ГВ и их производных на рост растений пшеницы в отсутствие (А) и присутствии (Б) меди в условиях полевого эксперимента. 1 – контроль; 2– СНА-Pow, 3 – СНР-НВQ250-5%, 4 – СНР-НВQ250-12%, 5 – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Рассчитанные константы связывания меди в почвенной среде были на порядок меньше аналогичных величин, полученных в экспериментах в водных средах, и составили 9.9×10^2 , 2.7×10^3 , 2.0×10^4 для препаратов СНА-Pow, СНР-НВQ250-5% и СНР-НВQ250-12%, что соответствует химическим константам связывания. Высокие константы связывания меди модифицированными ГВ свидетельствуют о перспективности их применения в качестве детоксикантов почв, загрязнённых ТМ.

Таким образом, защитное действие ГВ по отношению к растениям в присутствии ТМ в почвенной среде, как и в водной, обусловлено связыванием токсиканта. При этом, как и в случае гербицидного стресса, наблюдается выраженное снижение защитного действия ГВ при переходе от водных сред к почвенным.

Проведенные эксперименты в условиях стрессов, вызываемых токсикантами, показали, что защитное действие ГВ в почвенных средах обусловлено, прежде всего, связывающей способностью ГВ по отношению к токсикантам. В водной среде, напротив, защитное действие ГВ обусловлено не только их взаимодействием с токсикантами, но также и собственной биологической активностью. В случае высоких констант связывания (ТМ), ведущую роль играет образование нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как при слабом химическом взаимодействии (гербициды) на первое место выходит собственная физиологическая активность ГВ. Наблюдаемое выраженное уменьшение защитных свойств ГВ при переходе от водных сред к почвенным связано, по-видимому, со снижением их доступности для растений. Целью следующего этапа работы было изучение защитного действия ГВ в условиях абиотических стрессов, когда образование нетоксичных комплексов не может объяснить защитное действие ГВ.

Глава 5. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза

В настоящее время хорошо известно, что ГВ способствуют поступлению в растения различных микроэлементов, недостаток которых вызывает заболевания, известные под названием хлороз. Однако защитное действие самих ГВ в этих условиях изучено недостаточно, что определило направление дальнейших экспериментов: исследование защитного действия ГВ и их комплексов с железом в условиях недостатка железа.

У растений существует два основных способа поглощения железа, обычно называемые стратегиями I и II. Растения со стратегией I (двудольные и однодольные, кроме мятликовых) способны снижать значение pH в области ризосферы, что способствует восстановлению железа из формы Fe(III) в Fe(II). Поступление в клетку осуществляется путём связывания с железовосстанавливающими белками, ассоциированными с клеточными мембранами. Растения со стратегией II (мятликовые) выделяют т.н. фитосидерофоры, которые хелатируют Fe(III). Так как способ поглощения железа мог сказаться на величине защитного действия ГВ, нами были проведены эксперименты с растениями, обладающими как стратегией I, так и II.

5.1. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в водной среде

Для исследования защитного действия ГВ в условиях железодефицитного хлороза в качестве тест-объектов использовали растения пшеницы (стратегия I) и томатов *Lycopersicon esculentum* Mill. (стратегия II). Железо вносили в виде сульфата железа FeSO₄, хелата железа Fe(III)-ДТПА (комплекс железа с диэтилентриаминопентауксусной кислотой) или в виде совместного раствора ГК угля СНА-Pow с FeSO₄. В ходе проведения эксперимента оценивали эффективность фотосинтеза растений, а по окончании – учёт длины и биомассы растений и содержание хлорофилла.

Как видно из результатов экспериментов (табл. 5.1) в выбранных условиях (высокое значение pH) внесение железа в виде простой соли не влияло на состояние растений из-за окисления железа из формы Fe(II) в форму Fe(III). При добавлении железа в доступной для растений форме (хелаты) было отмечено его положительное

влияние. При этом томаты оказались более чувствительными к недостатку железа, о чем свидетельствует более выраженное стимулирующее действие использованных хелатов. Сходным, но менее выраженным эффектом, обладало и совместное внесение железа с ГК угля, что подтверждает данные предыдущих исследователей о способности ГВ образовывать хелатные комплексы с металлами и свидетельствует о перспективности их использования для коррекции железодефицитного хлороза.

Табл. 5.1. Накопление биомассы, эффективность фотосинтеза и содержание хлорофилла в присутствии различных источников железа и ГВ

Вариант	Вес	Длина	Фотосинтез		Хлорофилл	
			СЭТ	Выход	Содержание	а/б
% от контроля (среда Хогланда без железа)						
Томаты (стратегия I)						
FeSO ₄	90±12	97±12	104±11	103±17	142±15	189±14
Fe(III)-ДТРА	4649±35	282±18	179±13	149±15	856±29	208±24
СНА-Pow	110±11	105±10	200±11	154±21	107±11	156±12
FeSO ₄ +СНА-Pow	4382±56	265±19	189±15	148±17	819±31	221±16
Пшеница (стратегия II)						
FeSO ₄	101±5	105±12	97±7	100±8	101±11	95±10
Fe(III)-ДТРА	172±12	146±12	218±15	197±12	200±11	205±5
СНА-Pow	121±15	138±12	344±11	329±13	154±12	130±13
FeSO ₄ +СНА-Pow	123±15	125±11	212±15	216±14	179±11	198±14

СЭТ – скорость электронного транспорта, Выход – выход фотосинтеза ± – стандартное отклонение.

Следует отметить, что при внесении ГК угля без железа наблюдали сравнимую, а в случае с растениями пшеницы – большую эффективность самих ГВ, чем их смеси с железом. Так как использованные ГК подвергали предварительному обессоливанью, обеспечивающему удаление обменного Fe, можно предположить, что растения способны использовать эндогенное железо, входящее в состав ГК. В пользу этого предположения свидетельствует также повышенное содержание хлорофилла в присутствии ГК в томатах и пшенице: (107±11)% и (154±12)% соответственно. Более высокая отзывчивость растений со стратегией II (пшеница) объясняется, по-видимому, преимущественным присутствием железа в ГК в форме Fe(III), т.е. в форме, в которой происходит его усвоение растениями со стратегией II, но не I.

Проведенные эксперименты продемонстрировали также положительное влияние ГК на фотосинтез растений: скорость электронного транспорта в присутствии ГК для растений томатов и пшеницы возросла до (200±11)% и (344±11)%, а выход фотосинтеза – до (154±12)% и (329±13)%, что значительно превышало наблюдаемый положительный эффект от внесения железосодержащих препаратов. Это свидетельствует о наличии дополнительного механизма защитного действия ГК в условиях железодефицитного хлороза, чем непосредственно поглощение растениями эндогенного железа из ГК.

Таким образом, нами было показано, что ГК оказывают защитное действие в условиях железодефицитного хлороза по отношению к растениям как со стратегией I, так и II. Полученные эксперименты позволяют высказать предположение о наличии другого, чем поглощение эндогенного железа, механизма защитного действия ГВ.

5.2. Защитное действие ГВ в условиях железодефицитного хлороза в почвенной среде

Для изучения защитного действия ГВ в условиях железодефицитного хлороза в почвенных условиях на первом этапе проводили эксперименты с использованием инертного субстрата перлита, что позволило исключить влияние почвенных ГВ. В качестве тест-объектов использовали пшеницу и томаты. Железо вносили в перлит в виде FeSO_4 , Fe(III)-ДТПА или в виде совместного раствора ГВ с FeSO_4 . Как показали проведённые эксперименты (табл. 5.2), в целом внесение исследуемых препаратов оказало положительное влияние на растения.

Табл. 5.2. Накопление биомассы и содержание хлорофилла в растениях томатов и пшеницы присутствии различных источников железа и ГК угля в условиях железодефицитного хлороза на перлите

Вариант	Вес	Длина	Содержание хлорофилла
	% от контроля (среда Хогланда без железа)		
	Томаты (стратегия I)		
FeSO_4	111±6	103±2	113±9
Fe(III)-ДТПА	92±5	104±4	79±15
CHA-Pow	104±3	107±3	106±2
FeSO_4 +CHA-Pow	114±3	110±3	102±4
	Пшеница (стратегия II)		
FeSO_4	101±2	101±2	–
Fe(III)-ДТПА	117±7	113±4	–
CHA-Pow	109±7	106±3	–
FeSO_4 +CHA-Pow	110±4	108±4	–

± – стандартное отклонение

Как и в случае проведения экспериментов с водными культурами, растения пшеницы оказались более отзывчивыми к внесению исследованных препаратов с доступным Fe, однако их эффективность на перлите была значительно ниже. Положительный эффект от Fe-ДТПА на накопление растениями биомассы в условиях водных культур составил (172±12)%, а на перлите – (117±7)% от контроля. В случае ГК аналогичный показатель снизился с (121±15)% до (110±4)%. Для растений томатов снижение эффективности использованных препаратов было ещё более ярко выражено.

Таким образом, на основании проведённых экспериментов можно сделать вывод о том, что защитное действие ГВ по отношению к растениям в условиях железодефицитного хлороза на водных культурах значительно более выражено, чем на перлите. Наблюдаемые эффекты объясняются, по-видимому, меньшим поглощением ГВ и исследованных железосодержащих препаратов в условиях твёрдого субстрата. Так как в экспериментах использовали инертный наполнитель, не обладающий связывающей способностью по отношению к исследованным препаратам, можно предположить, что в почвенных условиях защитное действие ГВ и железосодержащих препаратов будет ещё менее выражено.

Почвенные эксперименты проводили с использованием серозёма – почвы, характеризующейся высоким значением pH и, вследствие этого, незначительным содержанием доступного для растений Fe. Полученные результаты (табл. 5.3)

продемонстрировали отсутствие статистически значимого защитного действия использованных препаратов в выбранных условиях.

Табл. 5.3. Длина, вес и содержание хлорофилла в растениях томатов в присутствии различных источников железа и ГК угля в условиях железодефицитного хлороза на почве

Вариант	Вес	Длина	Содержание хлорофилла
	% от контроля (серозём без внесения Fe)		
Томаты (стратегия I)			
FeSO ₄	89±12	100±3	103±2
Fe(III)-ДТПА	104±4	103±5	116±3
СНА-Pow	105±5	101±4	109±5
FeSO ₄ +СНА-Pow	101±4	105±4	102±2

± – стандартное отклонение

Из всех исследованных препаратов только синтетический хелат железа обладал выраженным положительным действием по отношению к томатам: в его присутствии было зафиксировано значимое увеличение содержания хлорофилла на 16% по сравнению с контрольными растениями. При этом положительного влияния Fe-ДТПА на накопление растениями биомассы или их рост отмечено не было. Отсутствие выраженного положительного влияния вносимых ГВ по отношению к растениям в почвенных условиях можно объяснить присутствием в самой почве значительного количества ГВ. Содержание гумуса в исследованной почве составляло 4.5%, поэтому внесение ГК в дозе 40 мг/кг почвы приводило к увеличению содержания ГВ в почве менее чем на 0.1%. Можно предположить, что положительный эффект ГК нивелировался на фоне действия ГВ, изначально присутствовавших в почве.

Таким образом, эксперименты показали выраженное защитное действие ГВ и их комплексов с железом в условиях железодефицитного хлороза в водных средах. В почвенных средах величина положительного действия ГВ снижается, что связано, по-видимому, с меньшим поглощением ГВ в условиях твёрдого субстрата.

Глава 6. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита, солевого стресса и неблагоприятных температур

Эксперименты проводили биотестированием по методу проростков с использованием пшеницы.

6.1. Защитное действие ГВ в условиях водного дефицита

Для создания водного стресса использовали раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 Д (ПЭГ 6000) в концентрации 100 г/л, являющегося гиперосмотическим раствором.

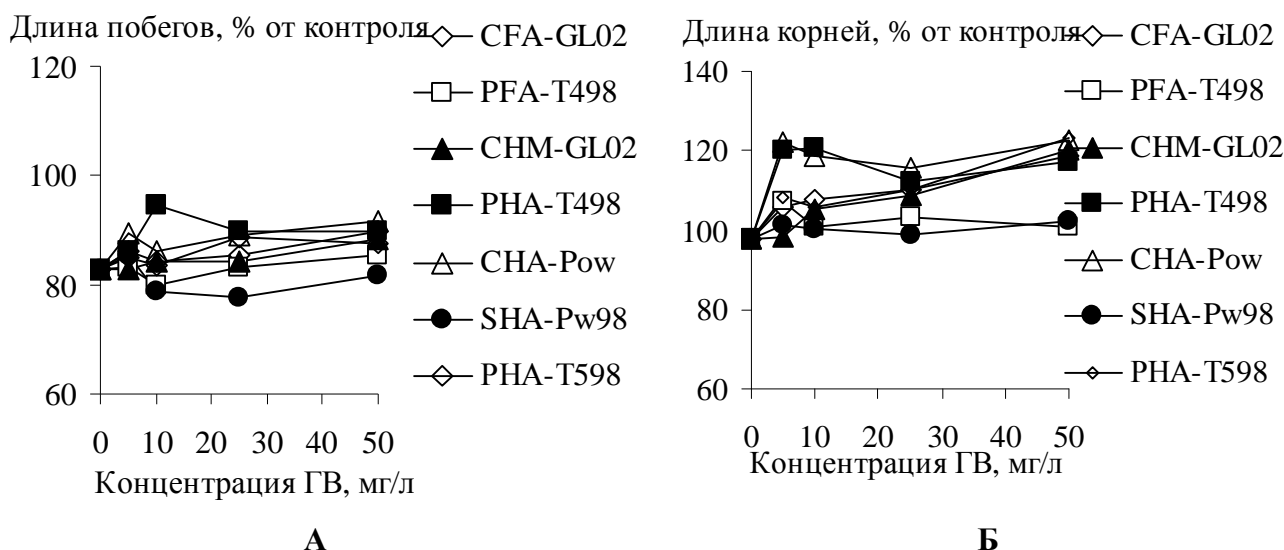


Рис. 6.1. Влияние ГВ на длину побегов (А) и корней (Б) проростков мягкой пшеницы *T. aestivum* в присутствии ПЭГ 6000 в концентрации 100 г/л.

Внесение препаратов ГВ способствовало адаптации растений к недостатку воды (рис. 6.1А). При концентрациях 5-10 мг/л было отмечено значимое увеличение длины побегов проростков, которое затем снижалось до контрольных величин. Максимальное действие было отмечено для ГК и ФК торфа, которые характеризовались как минимальными молекулярными массами, так и наименьшим содержанием карбоксильных и сложноэфирных групп. Минимальные эффекты были зарегистрированы для ГК угля. При этом следует отметить, что ни для одного из исследованных препаратов не было отмечено полное снятие негативного действия ПЭГ 6000 на растения.

В ходе проведения экспериментов было зафиксировано выраженное стимулирующее действие ГВ на корни побегов в присутствии ПЭГ 6000 (рис. 6.1Б), хотя в вариантах без его внесения влияния ГВ на корни и побеги отмечено не было. Величины максимального наблюдаемого эффекта для всех исследованных препаратов изменялись от $(102 \pm 3)\%$ до $(123 \pm 3)\%$ и свидетельствовали о способности ГВ стимулировать рост корней пшеницы в условиях водного стресса, вызванного присутствием ПЭГ 6000. Полученные результаты хорошо согласуются с данными других исследователей, наблюдавшими увеличение физиологической активности ГВ в стрессовых условиях. Принимая во внимание тот факт, что наблюдаемый положительный эффект от внесения ГВ не может быть обусловлен связыванием препаратов с ПЭГ (все эти вещества представляют собой отрицательно заряженные полиэлектролиты), можно сделать вывод о способности ГВ снижать негативное действие водного стресса благодаря непосредственному влиянию на растения.

6.2. Защитное действие ГВ в условиях солевого стресса

Исследование защитного действия ГВ в условиях солевого стресса, создаваемого с помощью 0.15 М NaCl, проводили с использованием природных и силилированных (обогащённых кремнием) препаратов, так как ранее нами было показана высокая защитная активность природных ГВ с высоким содержанием кремния (Глава 3.1, рис. 3.3). Для этой цели в структуру природных ГК угля вводили алкоксисилильные

фрагменты $(-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3)$ для получения производных с различным содержанием кремния. При внесении в водную среду указанные фрагменты гидролизуются с образованием силанольных групп, что позволяет рассматривать полученные препараты в качестве моделей природных органо-минеральных комплексов. Всего было исследовано 5 препаратов модифицированных ГВ с содержанием кремния 2-11%.

Результаты биотестирования показали, что растения пшеницы, пророщенные в растворах ГВ, обладали большей устойчивостью к солевому стрессу, чем контрольные. При этом было установлено, что защитное действие ГВ возрастает с увеличением содержания в них кремния до 8%, а затем – снижается (рис. 6.2).

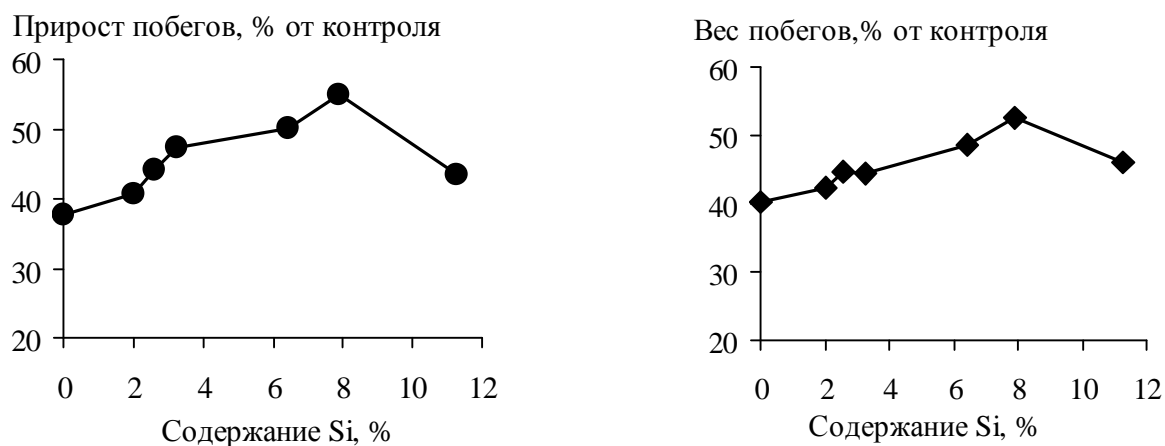


Рис. 6.2. Влияние ГВ и их силилированных производных с различным содержанием кремния на прирост корней и сырую биомассу побегов пшеницы.

Проведённые эксперименты показали перспективность дальнейшего исследования силилированных препаратов ГВ в качестве биоактиваторов в условиях солевого стресса.

6.3. Защитное действие ГВ в условиях температурного стресса

Для создания температурного стресса чашки семена пшеницы проращивали при температуре 35°C (высокотемпературный стресс) или при 4°C (низкотемпературный стресс). В качестве контрольных использовали проростки, выращенные при 24°C.

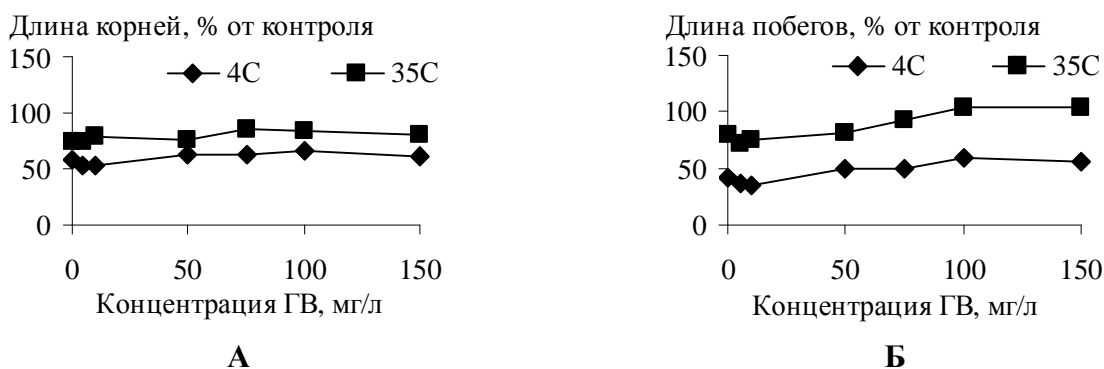


Рис. 6.3. Влияние ГК угля СНА-Row на длину корней (А) и побегов (Б) проростков пшеницы в условиях пониженной и повышенной температуры.

Результаты, представленные на рис. 6.3А, показывают, что в условиях температурных стрессов внесение ГК до концентрации 150 мг/л не оказало значимого влияния на рост корней пшеницы. В то же время, при +35°C было отмечено

выраженное положительное влияние ГК на побеги пшеницы (рис. 6.3Б), которое приводило к полному снятию угнетающего действия повышенной температуры. При +4°C защитное действие ГВ было менее выражено.

Наиболее выраженное действие ГВ в условиях температурных стрессов наблюдали при концентрации 100 мг/л, поэтому сравнение защитного действия ГВ различного происхождения проводили при указанной концентрации (рис. 6.4).

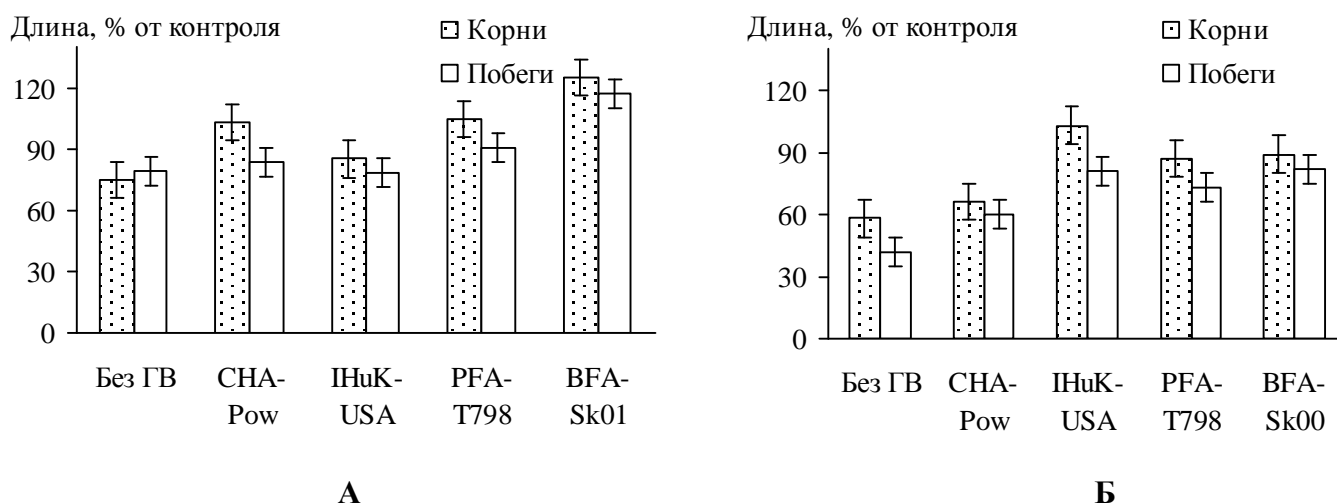


Рис. 6.4. Защитное действие ГВ различного происхождения по отношению к проросткам пшеницы в условиях высоко-(А) и низкотемпературного (Б) стрессов.

Как видно из рис. 6.4А, при 35°C внесение ГВ приводило к частичному или полному снятию стресса у проростков пшеницы: в случае с ГК сапропеля наблюдали увеличение длины побегов до 125% от контроля. При этом в целом можно сказать, что ГК оказались более эффективны, чем ГК, а корни – более чувствительны, чем побеги.

В условиях пониженных температур (рис. 6.4Б) защитное действие ГВ было менее выражено, а полное снятие угнетающего действия было отмечено только при использовании ГК угля. Возможно, это связано с тем, что в экспериментах с пониженной температурой величина стресса была значительно выше, чем при повышенной температуре (рис. 6.4). Поэтому дополнительно были приведены эксперименты при температуре 38°C, когда наблюдается более выраженный высокотемпературный стресс. В данных условиях было установлено снижение защитного действия ГВ: максимальное увеличение длин корней и побегов проростков составило всего (6±4)% и (7±4)%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГВ способны частично или полностью нивелировать высоко- и низкотемпературный стрессы, а величина защитного действия ГВ зависит от величины вызываемого стресса. Следует особо подчеркнуть, что в проведенных исследованиях ГВ способствовали адаптации растений к температурным стрессам, вызывающим разнонаправленные ответные реакции в организмах. Например, белки и липиды, адаптированные к высокой температуре, находятся соответственно в денатурированном состоянии и в состоянии твёрдого геля, т.е. в неадаптированном состоянии по отношению к низким температурам. Поэтому полученные результаты свидетельствуют об участии ГВ не в

специфических реакциях, характерных для того или иного вида стрессового воздействия, а в общих защитно-приспособительных реакциях растительного организма.

Глава 7. Природа защитного действия ГВ

Проведённые исследования показали, что защитное действие ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов более ярко выражено в водных, чем в почвенных средах, а величина наблюдаемого действия зависит от величины вызываемого стресса. На рис. 7.1. представлен график, иллюстрирующий полученные результаты по защитному действию ГВ в различных стрессовых условиях в водных средах и показывающий его зависимость от уровня стресса, который рассчитывали как разницу между значением тест-отклика в контрольных ($R_0 = 100\%$) и стрессовых условиях ($R_0 - R_T$). При таком способе расчета 100% стресс означает гибель организма, а нулевой – состояние контроля. Так как действующее начало ГВ неизвестно, для обобщения данных использовали результаты по максимальному наблюдавшемуся эффекту ГВ вне зависимости от концентрации. Из рассмотрения исключали результаты экспериментов с медью, где ведущую роль играла связывающая способность ГВ (Глава 4).

Как видно из рис. 7.1, величина защитного действия ГВ практически не зависела от вида стресса, а определялась, главным образом, его уровнем. Разница между вариантами без внесения ГВ и в их присутствии оказалась практически постоянной величиной, которая составляла $(17 \pm 4)\%$ при $P = 95\%$.

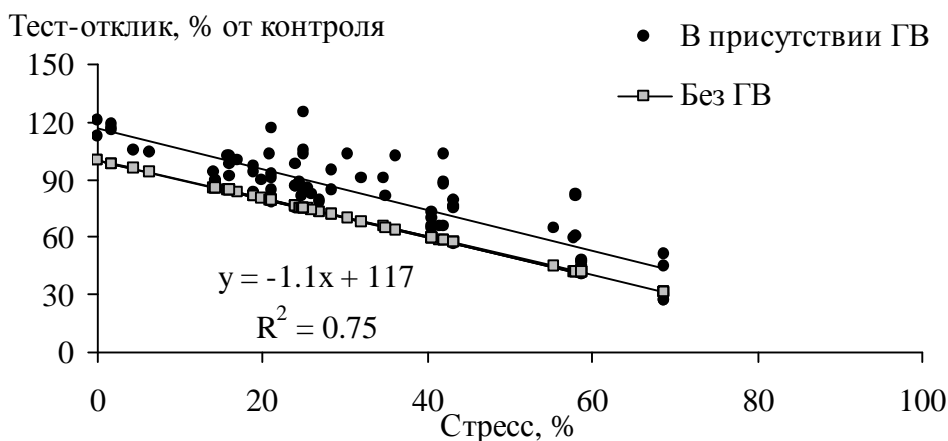


Рис. 7.1. Зависимость величины защитного действия ГВ от уровня стресса.

Разнообразие стрессовых факторов, при которых регистрируется положительное действие ГВ, а также независимость величины защитного действия ГВ от вида стресса свидетельствует о неспецифической природе защитного действия ГВ. В случае ТМ (или других токсикантов, с которыми возможно интенсивное связывание) указанная закономерность не соблюдается так как эффект неспецифического защитного действия ГВ гораздо меньше, чем эффект химического связывания токсикантов.

При исследовании реакций организмов на стресс принято выделять несколько стадий, таких как первичная неспецифическая реакция и собственно адаптация. Адаптация подразумевает запуск высокоспецифичных реакций, поэтому следует

предполагать участие ГВ именно в каскаде первой группы реакций. В стрессовых условиях наиболее чувствительным компонентом клеточных структур, выполняющим роль пускового механизма, вызывающего последующие изменения в обмене веществ, в большинстве случаев выполняют мембранные системы. Следовательно, можно предположить, что защитное действие ГВ обусловлено их непосредственным взаимодействием с мембранами и зависит от биодоступности ГВ. Поэтому далее нами было проведено исследование, направленное на изучение поступления ГВ в клетки и растения и распределения в них. Эксперименты проводили с использованием меченных тритием ГВ.

7.1. Характеристика меченных тритием ГВ

Препараты меченных тритием ГВ (^3H -ГВ), предоставленных Г.А. Бадуним (кафедра радиохимии МГУ им. Ломоносова), проверяли на идентичность исходным методом эксклюзионной гель-хроматографии с одновременной детекцией по радиоактивности и УФ-поглощению при 254 нм (рис. 7.2)

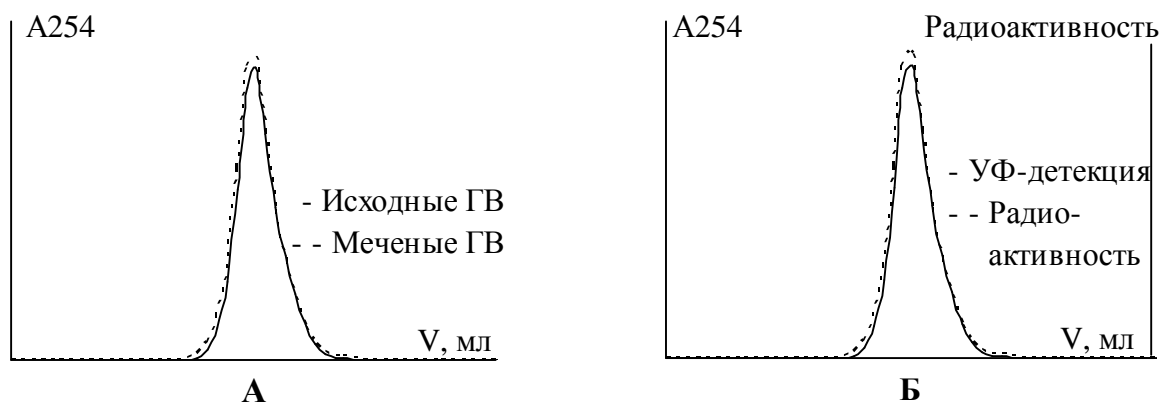


Рис. 7.2. Гель-хроматограммы исходных и ^3H -ГВ (А) и ^3H -ГВ с детекцией по УФ-поглощению и радиоактивности (Б). На примере СНА-Pow.

Совпадение УФ-гель-хроматограмм ^3H -ГВ и исходных ГВ (рис. 7.2А) свидетельствует о том, что введение метки не приводило к изменению молекулярно-массового распределения ГВ. Идентичность гель-хроматограмм ^3H -ГВ с детекцией по радиоактивности и УФ-поглощению (рис. 7.2Б) позволяет сделать вывод об отсутствии деструкции ГВ и равномерном введении метки во все структурные фрагменты ГВ. Всего в работе было использовано 10 образцов ^3H -ГВ, охарактеризованных по поверхностной активности и гидрофобности.

7.2. Поступление ГВ различного происхождения в живые клетки в оптимальных и стрессовых условиях

В качестве модели живой клетки использовали грам-отрицательные бактерии кишечной палочки *Escherichia coli* XL1. Эксперименты проводили в оптимальных и стрессовых условиях. Использование стрессовых условий было необходимо для проверки гипотезы о нарушении мембранной проницаемости в условиях стресса. Эта гипотеза достаточно часто встречается в литературе, однако её экспериментальных доказательств практически не существует. Стресс создавали путём внесения в питательную среду NaCl, получая гиперосмотический раствор (0.15 М). При этом

полагали, что если гипотеза об изменении проницаемости клетки верна, то в условиях гиперосмотического стресса будет наблюдаться усиленное поступление ГВ в клетки.

В ходе проведения экспериментов определяли общее количество сорбированных ГВ и количество ГВ, поступивших во внутриклеточное пространство. На основании полученных данных строили изотермы сорбции (рис. 7.3.) и рассчитывали фактор бионакопления ГВ (табл. 7.1) как тангенс угла наклона зависимости количества поглощенных клетками бактерий ГВ от их равновесной концентрации [ГВ].

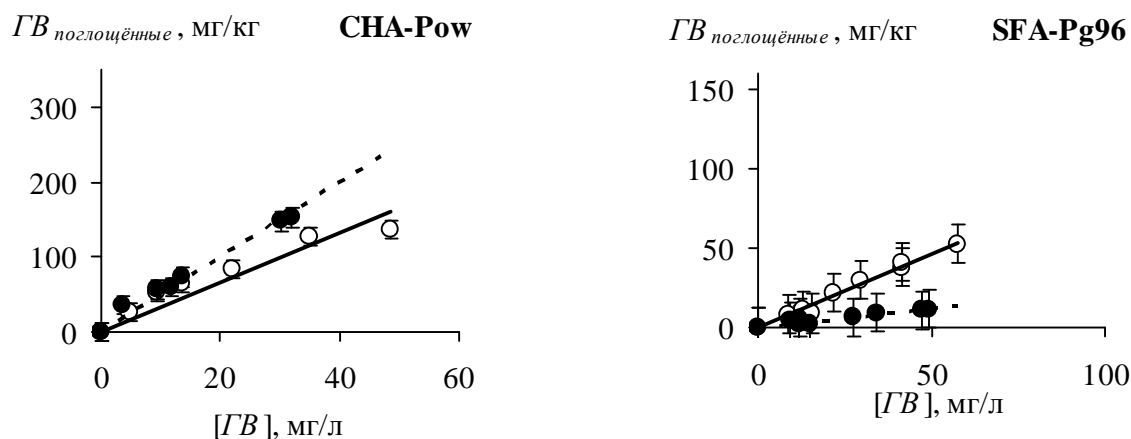


Рис 7.3. Поглощение ГВ клетками бактерий *E. coli* в оптимальных (сплошная линия) и стрессовых (пунктирная линия) условиях на примере CHA-Pow и SFA-Pg96.

Табл. 7.1. Поглощение ГВ клетками бактерий *E. coli* в оптимальных и стрессовых условиях

ГВ	Фактор бионакопления, л/кг		ГВ, поступившие в клетку при конц. 50 мг/л, мг/кг клеток	
	Оптимум	Стресс	Оптимум	Стресс
CHA-Pow	3.2±0.9	5.0±0.6	14±3	17±4
PFA-Sk300	1.8±0.7	6.9±0.8	8±1	32±5
PHA-Sk300	13.1±0.5	130±15	62±12	546±40
SFA-CtL00	0.9±0.5	1.5±0.5	1±1	3±1
SFA-Pg96	0.9±0.5	0.2±0.5	4±1	1±1
SHA-CtL00	2.3±0.6	5.3±0.3	6±1	11±2

Полученные значения факторов бионакопления ГВ составляли 0.9-13.1 л/кг. Наименьшие значения этого показателя были отмечены для ФК, а наибольшие – для ГК торфа. Количество ГВ, прошедших через мембрану, лежало в диапазоне 23-167 мг/кг клеток, что составляло 20-100% от общего количества поглощённых ГВ в случае ГК и ФК соответственно. Особый интерес представляют результаты, свидетельствующие об усиленном поглощении ГВ клетками бактерий в условиях солевого стресса. Этот эффект был отмечен для всех препаратов за исключением ФК почв, где не наблюдали значимого усиления поглощения в условиях солевого стресса. По всей видимости, установленное отличие в поведении SFA-Pg96 и SFA-CtL00 обусловлено низким уровнем взаимодействия этих ГВ с бактериями, что привело к высокой ошибке получаемых результатов.

Найденное усиление взаимодействия ГВ с бактериями в условиях солевого стресса может быть объяснено, прежде всего, изменением форм существования ГВ в этих условиях. Так, при повышении ионной силы раствора происходит частичная

компенсация отрицательного заряда и гидрофобизация макромолекул ГВ, что может приводить к их усиленной сорбции на клеточной поверхности. С другой стороны, известно, что под действием осмотического шока возможно образование «дыр» в мембранах, т.е. отверстий большого диаметра, в которые могут поступать высокомолекулярные соединения, не проникающие в клетку в обычном состоянии. Полученные результаты по усилению поступления ГВ в клетки под воздействием стрессового фактора хорошо согласуются с ранее показанной возрастающей биологической активностью ГВ при неблагоприятных условиях.

Сопоставление свойств ГВ с параметрами их взаимодействия с бактериями показало наличие значимой положительной корреляционной взаимосвязи между количеством ГВ, поступивших в клетку, и поверхностной активностью ГВ. При этом наличие взаимосвязи наблюдали как для оптимальных ($r = 0.97$), так и для стрессовых условий ($r = 0.99$).

7.3. Поступление ГВ различного происхождения в растения в оптимальных и стрессовых условиях

Поступление ГВ в растения изучали, проращивая семена пшеницы в растворах, содержащих меченные тритием ГВ в концентрации 10-50 мг/л. По окончании экспонирования проводили учёт биомассы растений, а в растворах по радиоактивности определяли равновесную концентрацию ГВ. Распределение меченых ГВ в растениях изучали с помощью автордиографии. О концентрации ГВ в различных частях растений судили путем определения оптической плотности D на сканированных автордиограммах.

При исследовании взаимодействия ГВ с растениями пшеницы нами было обнаружено, что их поглощение в целом сходно с процессами поступления в растения ионов и индивидуальных веществ. Было установлено, что поступление ГВ в растения характеризуется стадией обратимого поглощения, при котором ГВ адсорбируются поверхностью корня и могут быть легко десорбированы, сменяющейся стадией стационарного поглощения, в ходе которой наблюдается поступление веществ в сосудистую систему растений (рис. 7.4).

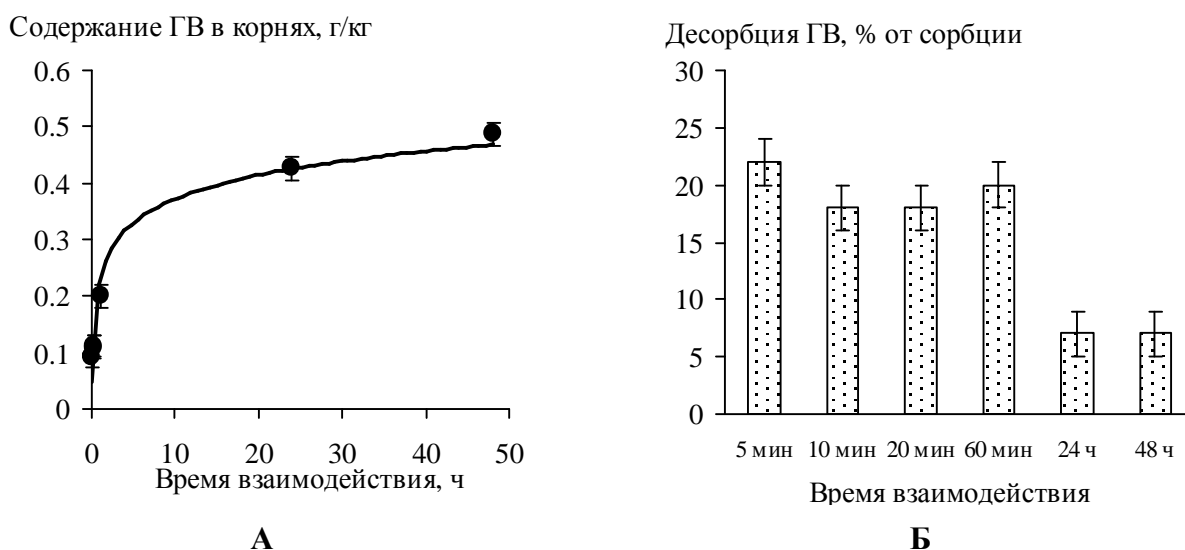


Рис. 7.4. Зависимость поглощения (А) и десорбции (Б) меченных тритием ГВ угля (^3H -СНА-Ров) растениями пшеницы от времени экспозиции.

Следует подчеркнуть, однако, что поступление ГВ в растение отличалось рядом особенностей. Так, полученные данные (рис. 7.4А) свидетельствуют, что накопление ГВ в растениях связано не только с их поступлением в растение, но и с адсорбцией на поверхности корней. Обращает на себя внимание также большая продолжительность обратимой стадии (рис. 7.4Б), которая для ГВ составляла по крайней мере 1 ч, в то время как для аналогичная величина для ионов и индивидуальных веществ обычно не превышает 15 мин. Можно предположить, что непосредственно перед поглощением ГВ растениями происходит их частичная трансформация.

Количественное описание кинетики поглощения ГВ растениями (рис. 7.5) проводили с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен, обычно используемым при описании поглощения ионов и веществ растениями:

$$V = \frac{V_{max} [C]}{K_m + [C]} \quad (7.1)$$

где V – скорость поглощения вещества; $[C]$ – концентрация вещества в растворе; V_{max} – максимальная скорость поглощения; K_m – константа Михаэлиса, отражающая концентрацию вещества, при которой наблюдается половинная от максимальной скорость поглощения. Значения параметров уравнения Махаэлиса-Ментен для использованных ГВ приведены в табл. 7.2. Высокие значения коэффициентов детерминации R^2 свидетельствуют о том, что наблюдаемая кинетика поглощения ГВ удовлетворительно описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, что позволяет высказать предположение об активном поглощении ГВ растениями.

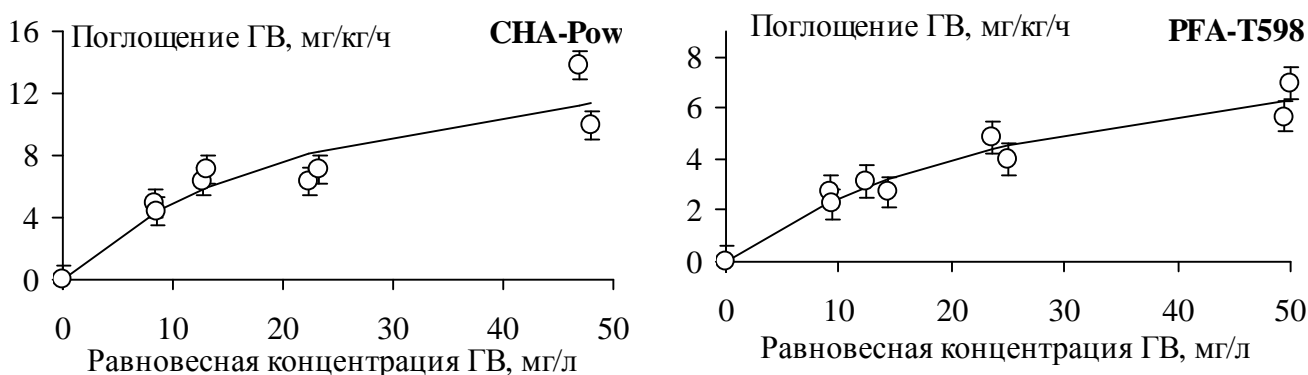


Рис. 7.5. Кинетика поглощения ГВ различного происхождения растениями пшеницы.

Табл. 7.2. Параметры кинетики поглощения ГВ растениями пшеницы

Препарат ГВ	Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен		R^2
	K_m , мг/л	V_{max} , мг/кг/ч	
CHA-Pow	25±5	17±3	0.96
PFA-T598	32±6	10±3	0.98
PHA-T598	28±7	54±8	0.91
CHM-Pow	40±9	14±5	0.96
CHM-GL02	14±5	6±2	0.97
AFA-SR	15±4	8±2	0.90

± – доверительный интервал при $P = 90\%$.

Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для ГВ (табл. 7.2) свидетельствуют о сравнительно невысокой скорости их поступления в растения. При пересчёте с использованием значений M_w (табл. 1.1) V_{max} ГВ будет находиться в диапазоне 0.9-4.2 нмоль/г/ч, тогда как обычно аналогичные величины составляют десятки-сотни нмоль/г/ч. Диапазон значений K_m составит 2.1-7.0 мкмоль/л, что сопоставимо со значениями этой константы для ионов и индивидуальных веществ (0.02 до 120 мкмоль/л). Наблюдаемая низкая скорость поглощения ГВ обусловлена, по-видимому, поступлением ГВ в растения не в неизменном виде, а лишь после предварительной частичной трансформации на поверхности корней растений или непосредственно в растворе под действием выделяемых корнями эксудатов.

Сопоставление кинетики поглощения ГВ с их свойствами показало, что скорость поступления ГВ в наибольшей степени определяется гидрофобностью и M_w ГВ (рис. 7.5).

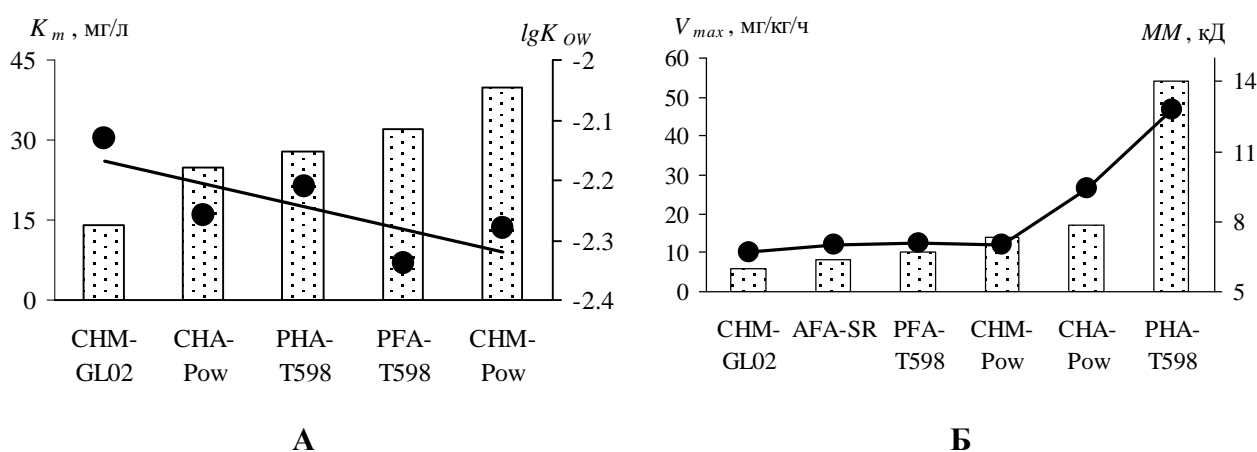


Рис. 7.5. Зависимость константы Михаэлиса K_m поглощения растениями пшеницы ГВ различного происхождения от октанольно-водного коэффициента (А) и молекулярной массы (Б) ГВ.

С увеличением M_w ГВ наблюдали рост V_{max} . Это кажущееся противоречие можно объяснить тем, что поглощение ГВ в значительной степени обусловлено их адсорбцией на поверхности корней, которое увеличивается с возрастанием M_w ГВ. Другая тенденция (рис. 7.5А) показывает, что K_m находилась в обратной зависимости от гидрофобности ГВ, т.е. при увеличении гидрофобности ГВ концентрация, при которой наблюдали половинную от максимальной скорость поглощения ГВ наступала раньше. Установленные закономерности могут свидетельствовать о преимущественном поступлении в растения гидрофобных фракций ГВ.

Наличие ГВ в побегах растений, показанное с помощью автордиографии (рис. 7.6), доказывает возможность перемещения поступивших в растения ГВ вместе с ксилемным током. Эксперименты по поглощению ГВ листьями растений, с другой стороны, показали возможность перемещения ГВ также и с флоэмным током: метка обнаруживалась не только непосредственно в листе, находившемся в контакте с мечеными ГВ, но также во втором листе и корнях.



Рис. 7.6. Распределение ^3H -СНА-Pow в побегах пшеницы по результатам тритиевой автордиографии. Время экспонирования для корней 4 ч, для побегов 97 сут.

Анализ полученных автордиограмм показал преимущественную локализацию ГВ в корнях растений, тогда как в побеги поступало значительно меньшее количество ГВ. Отношение оптических плотностей D в корнях и побегах, нормированное на время экспонирования, составило 40.7 ± 0.3 для ГК угля и 10 ± 2 для ФК вод. С учётом массы корней и побегов растений можно рассчитать, что в корнях аккумулируется в 22 раза больше ГК угля, чем в побегах; для ФК аналогичный показатель составляет 5. Это свидетельствует о том, что ФК способны поступать из корней в надземные органы растений в большем количестве, чем ГК.

Распределение поступивших ГВ в корнях и побегах также оказалось неоднородным: было показано локальное увеличение их концентрации в апикальных частях (рис. 7.6). Оптическая плотность в кончиках корней превышала таковую в среднем по корню в 2 раза; аналогичное отношение для побегов составило 8. Следовательно, ГВ накапливаются преимущественно в апикальных частях растений, где происходит наиболее активный клеточный биосинтез.

Сравнительное изучение поглощения ГВ при повышенной (35°C) и пониженной (4°C) температуре, избыточном и недостаточном освещении и при солевом стрессе показало его зависимость от внешних условий (рис. 7.7). Выраженное уменьшение поглощения ГВ наблюдали, когда растения подвергали стрессам, вызывающим снижение скорости метаболических реакций (пониженная температура и отсутствие освещения), а увеличение – при стрессах, активирующих метаболизм (повышенная температура, избыточное освещение и солевой стресс). Таким образом, было установлено, что поглощение ГВ растениями напрямую связано со скоростью метаболических процессов.

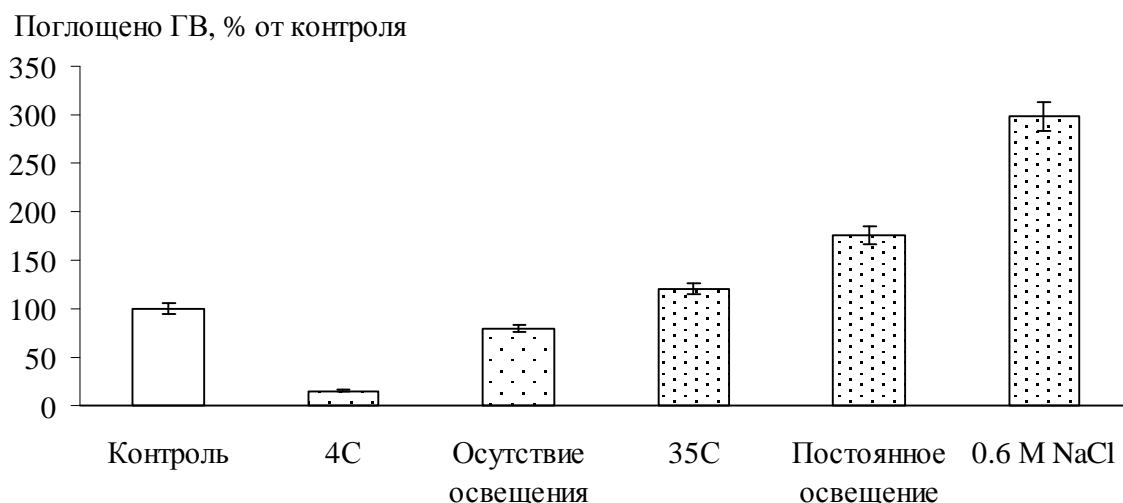


Рис. 7.7. Поглощения ГВ растениями пшеницы в различных условиях.

Наименьшее поглощение ГВ наблюдали при понижении температуры до 4°C, когда поглощение веществ растениями обусловлено только их адсорбцией на поверхности корней. На основании температурной зависимости поглощения ГВ и соответствии кинетики их поглощения уравнению Михаэлиса-Ментен можно сделать вывод о поступлении ГВ в растения по механизму активного транспорта.

7.3. Идентификация ГВ в тканях растений

Исследование распределения ГВ в растениях на тканевом уровне показало их преимущественное накопление в липидах (табл. 7.3).

Табл. 7.3. Содержание ГВ в липидной фракции растений

ГВ	Содержание ГВ в липидной фракции, % от поглощённых		
	Корни	Побеги	Всего
СНА-Pow	82±6	16±2	98±8
AFA-SR	49±10	16±8	64±5

Было установлено, что 98% ГК, поглощённых растениями, обнаруживалось в липидной фракции. Для ФК этот показатель составлял около 64%, что связано, по-видимому, с их меньшей гидрофобностью. Так как в побегах для ГК и ФК наблюдали равное относительное количество поглощённых ГВ (16%), можно сделать вывод, что перед поступлением в надземные органы в корнях происходит предварительная трансформация ГВ, и в побеги поступают преимущественно гидрофобные фрагменты ГВ. Поиск возможных гидрофобных соединений в ГВ, проведённый с помощью гексановой экстракции с последующим определением состава методом газовой хроматографии (ГХ) (табл. 7.4) показал, что во всех исследованных препаратах ГВ обнаруживаются летучие жирные кислоты (ЛЖК) ряда C2-C6 (от уксусной до капроновой кислоты).

Табл. 7.4. Содержание ЛЖК в ГВ различного происхождения по данным ГХ

ГВ	C2	C3	i-C4	C4	i-C5	C5	i-C6	C6	S
	мкг/мг								
СНА-AGK	0.05	0.01	0.004	0.008	0.008	0.0042	0	0.03	0.114
PFA-Sk300	0.043	0.005	0.003	0.002	0.004	0.003	0	0.009	0.069
PFA-TL398	0.021	0.004	0.001	0.007	0.004	0.024	0	0.014	0.075
PHM-Sk300	0.037	0.007	0.002	0.008	0.005	0.045	0.001	0.016	0.121
PHА-Sk300	0.124	0.021	0.007	0.012	0.006	0.008	0	0.015	0.193

C2 – уксусная; C3 – пропионовая; C4 – масляная; i-C4 – изомасляная; C5 – валериановая; i-C5 – изовалериановая; C6 – капроновая; i-C6 – изокапроновая

Во всех препаратах наиболее высокое содержание было установлено для уксусной кислоты (в среднем 46% от общего содержания ЛЖК). Наряду с ЛЖК в хлороформ-гексановом экстракте ГК были также обнаружены олеиновая $C_{18:1}$ (2.7%) и пальмитиновая $C_{16:0}$ (1.5%) кислоты. Таким образом, полученные результаты доказывают возможность трансформации ГВ до компонентов, способных поступать в липидную фракцию растений.

Прямая идентификация ГВ в растениях, проведённая методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса, показала, что продукты метаболизма ГВ присутствуют в растениях в составе ненасыщенных ЖК $C_{18}H_{32}O_2$ и $C_{14}H_{24}O_2$. Первой молекулярной формуле соответствует более 40 соединений, однако большинство из них представляет собой феромоны насекомых или синтетические вещества. Поэтому с наибольшей вероятностью соединение $C_{18}H_{32}O_2$ является линолевой кислотой $C_{18:2}$ – ключевым соединением липидного обмена растений – являющейся одной из 4 основных ЖК растительных мембран. Линолевая кислота образуется при распаде липидов в растениях, усиливающимся при стрессах. Она является активатором различных процессов метаболизма и оказывает влияние на рост и морфогенез растений. Отсутствие линолевой кислоты непосредственно в экстрактах ГВ свидетельствует о том, что она образуется из предшественников непосредственно в растении. Общая схема биосинтеза ЖК в растениях и возможная роль в нём ГВ представлена на рис. 7.8.

Как видно из рис. 7.8, в ГВ представлен целый ряд веществ, участвующих в биосинтезе ЖК. Однако промежуточных продуктов, которые можно было ожидать исходя из обнаруженных в ГВ соединений – олеиновой и пальмитиновой кислот – в тканях растений обнаружено не было. Это свидетельствует о том, что поглощённые из ГВ соединения быстро усваиваются растениями, а определяемая линолевая кислота является продуктом деградации липидов, начинающемся при механическом повреждении листьев при их подготовке к анализу. В пользу этого предположения свидетельствует также второе идентифицированное соединение – $C_{14}H_{24}O_2$ – которое, по всей видимости, является промежуточным продуктом распада линолевой кислоты.

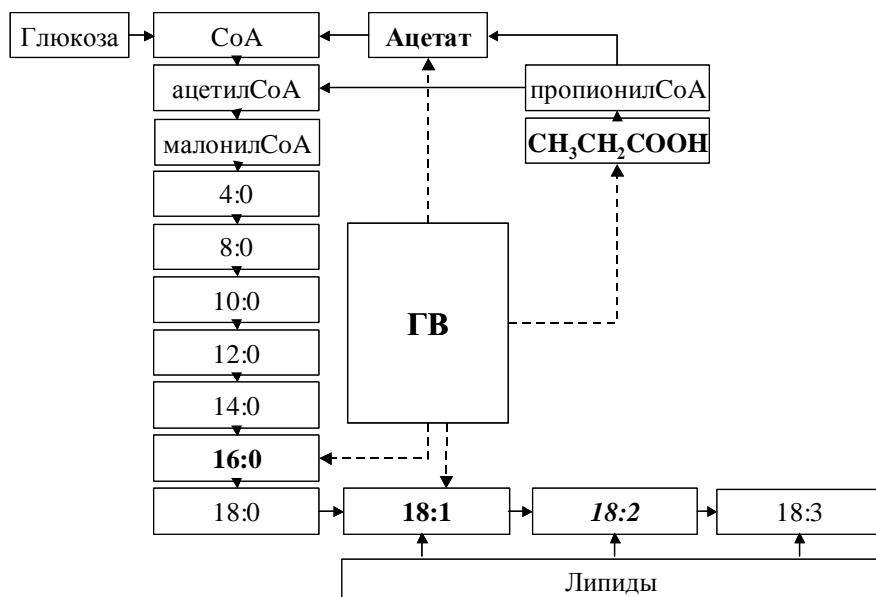


Рис. 7.8. Биосинтез ЖК в растениях и возможная роль в нём ГВ. На схеме жирным шрифтом выделены вещества, экспериментально обнаруженные в составе ГВ, а наклонным – в растениях.

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что наиболее вероятной схемой поступления ГВ в растения является первоначальная аккумуляция на поверхности корней, прикорневая-корневая трансформация и включение в метаболизм растений на уровне липидного обмена.

7.4. Природа защитного действия гуминовых веществ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов

Проведённые исследования позволили выявить следующие основные закономерности защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов в водных и почвенных средах:

- ГВ способствуют адаптации растений к разнообразным стрессовым факторам, в том числе вызывающим разнонаправленные ответные реакции в организмах;
- в присутствии токсикантов защитное действие ГВ обусловлено образованием нетоксичных комплексов ГВ-токсикант и собственной физиологической активностью ГВ; относительный вклад этих процессов зависит от силы взаимодействия ГВ с токсикантом и биодоступности ГВ;
- в условиях абиотических стрессов, не обусловленных присутствием токсикантов, величина защитного действия ГВ практически не зависит от вида стресса, а определяется, главным образом, его уровнем. Разница между вариантами без внесения ГВ и в их присутствии является практически постоянной величиной и не превышает 20%;
- при переходе от водных сред к почвенным наблюдается выраженное уменьшение защитных свойств ГВ, связанное со снижением их доступности для растений.

Разнообразие стрессовых факторов, при которых регистрируется защитное действие ГВ, а также независимость его величины от вида стресса свидетельствует о неспецифической природе защитного действия ГВ, обусловленного их

непосредственным взаимодействием с мембранами. Установленное в нашей работе включение ГВ в метаболизм ЖК и накопление ГВ в липидной фракции растений свидетельствует о преимущественном влиянии ГВ на липидный обмен, в том числе и липидную составляющую мембран. Повреждение липидной компоненты мембран в стрессовых условиях происходит вследствие процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), вызываемого образованием избыточного количества свободных радикалов, для тушения которых у растений синтезируется целый ряд антиоксидантов. Наши исследования показали, что ГВ также обладают высокой антиоксидантной ёмкостью (АОЕ), сопоставимой с таковой других высокоактивных природных антиоксидантов. Величины АОЕ ГВ изменялись в диапазоне 2.18-3.56 мкмоль тролоксового эквивалента/мг, что близко к АОЕ дигидрокверцетина (2.67 мкмоль/мг) – природного антиоксиданта растительного происхождения. Принимая во внимание установленные в работе особенности взаимодействия ГВ с клетками и растениями можно предложить следующий концептуальный механизм защитного действия ГВ (рис. 7.9).

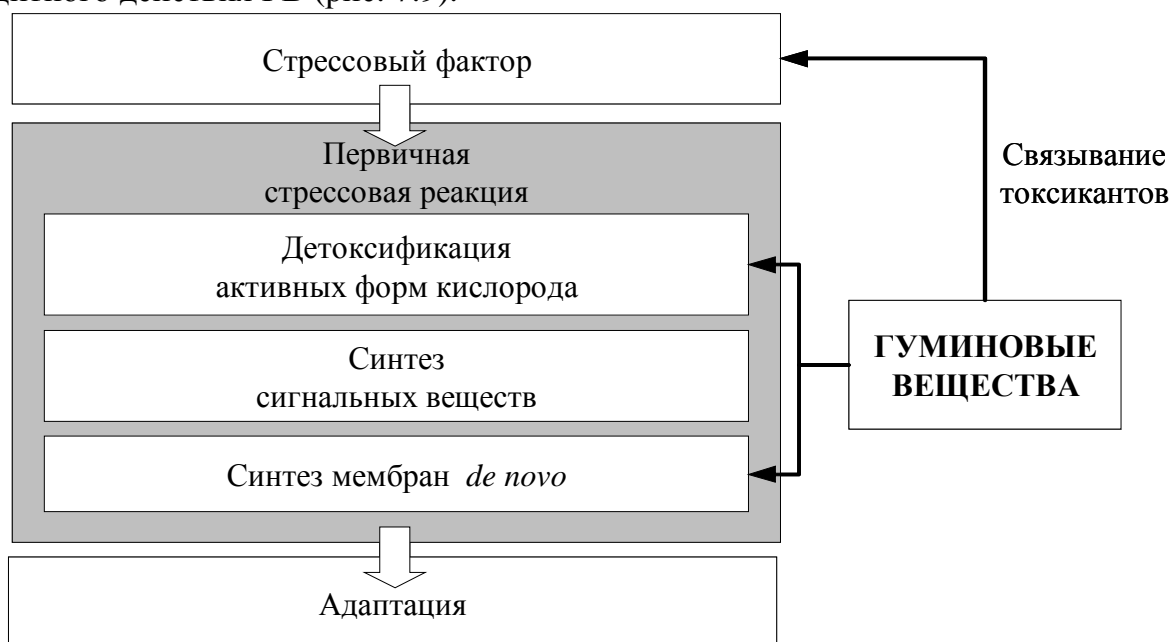


Рис. 7.9. Концептуальная модель неспецифического защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов.

Таким образом, выполненные в диссертационной работе исследования показали, что защитное действие ГВ по отношению к растениям в условиях абиотических стрессов обусловлено не только образованием комплексов ГВ с токсикантами, но также включением ГВ в липидный метаболизм растений и участием в неспецифических реакциях растений на стресс, направленных на восстановление повреждений мембранных структур вследствие разрывов в мембране и ПОЛ.

ВЫВОДЫ

1. Защитное действие ГВ в присутствии токсикантов в почвенных средах обусловлено, прежде всего, образованием нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, тогда как в водных средах значительный вклад может вносить собственная биологическая активность ГВ. В случае высоких констант связывания (тяжёлые

металлы), ведущую роль играет образование нетоксичных комплексов ГВ-токсикант, при слабом химическом взаимодействии (гербициды) доминирует собственная физиологическая активность ГВ.

2. При переходе от водных сред к почвенным наблюдается выраженное уменьшение защитных свойств ГВ, связанное со снижением их доступности для растений. В условиях абиотических стрессов в водных средах величина защитного действия ГВ не зависит от их происхождения или вида стресса. Разница между вариантами без внесения ГВ и в их присутствии является практически постоянной величиной и не превышает 20%. В случае тяжелых металлов (или других токсикантов, с которыми возможно интенсивное связывание) указанная закономерность не соблюдается вследствие небольших величин действия ГВ по сравнению с эффектами, определяемыми процессами связывания токсикантов.
3. ГВ способны сорбироваться на поверхности живых клеток и поступать во внутриклеточное пространство. Величины фактора бионакопления ГВ варьируются в диапазоне 0.9-13.1 л/кг. Количество ГВ, поступающих в клетки, возрастает при увеличении поверхностной активности ГВ и составляет 20-100% от общего количества поглощённых ГВ. В условиях солевого стресса происходит усиление поглощения ГВ клетками, при этом фактор бионакопления ГВ может возрастать в 10 раз по сравнению с оптимальными условиями.
4. Поглощение ГВ растениями в целом подчиняется закономерностям, установленным для ионов и индивидуальных веществ. Оно характеризуется наличием фазы обратимого малоизбирательного поглощения и фазы стационарного поглощения. Основной особенностью поступления ГВ в растения является большая продолжительность обратимой стадии, которая составляет не менее 1 ч, что связано с трансформацией ГВ перед их поглощением растениями.
5. Кинетика поглощения ГВ описывается уравнением Михаэлиса-Ментен. Диапазон значений константы Михаэлиса K_m составляет 2.1-7.0 мкмоль/л, что сопоставимо со значениями этой константы для ионов и индивидуальных веществ. Максимальная скорость поглощения ГВ возрастает при увеличении их гидрофобности и находится в диапазоне 0.9-4.2 нмоль/г/ч, что на несколько порядков ниже, чем для ионов и индивидуальных веществ.
6. ГВ аккумулируются преимущественно в корнях растений. Отношение количества ГВ в корнях к количеству в побегах изменяется в диапазоне от 10 до 22 и объясняется высокой адсорбцией ГВ на поверхности корней. Поступившие в растения ГВ накапливаются преимущественно в апикальных частях растений.
7. Поступление ГВ в растения происходит по механизму активного транспорта и напрямую связано со скоростью метаболизма растений.
8. ГВ аккумулируются преимущественно в липидной фракции растений. Продукты метаболизма ГВ присутствуют в составе ненасыщенных ЖК. Количество ГВ в липидной фракции от общего количества поглощённых ГВ составляет 64-98%.

9. Концептуальная модель защитного действия ГВ по отношению к растениям в условиях различных абиотических стрессов включает в себя поступление ГВ растения, включение их в липидный метаболизм растений и участие в неспецифических реакциях растений на стресс, направленных на восстановление мембранных структур вследствие разрывов в мембране и перекисного окисления липидов.
10. Усиление защитных свойств ГВ с целью их применения в сельском хозяйстве в качестве средств защиты растений может быть достигнуто с помощью соответствующей направленной модификации ГВ, а именно: введения хинонных фрагментов в ГВ для получения детоксикантов почв, загрязнённых тяжёлыми металлами; обогащения железом – для синтеза корректоров хлороза у растений и обогащения кремнием – для получения биоактиваторов.

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность:

- д.х.н., проф. И.В. Перминовой (химический ф-т МГУ) и сотрудникам её группы за предоставленные препараты природных и модифицированных ГВ и оказанную всестороннюю помощь;
- к.б.н., доц. Г.Ф. Лебедевой (каф. земледелия ф-та почвоведения МГУ) за постоянное внимание к работе и многолетнюю разностороннюю поддержку;
- д.б.н. О.В. Королёвой (Институт биохимии РАН) и сотрудникам её группы за помощь в организации биологических экспериментов, определении антиоксидантной активности ГВ и обсуждение результатов;
- к.х.н. Г.А. Бадуну, З.Я. Тясто и к.х.н. М.Г. Чернышевой (каф. радиохимии химического ф-та МГУ) за предоставленные меченные тритием ГВ и оказанную помощь в проведении радиохимических экспериментов;
- О.И. Филипповой (каф. земледелия ф-та почвоведения МГУ) и к.б.н. В.А. Холодову (Почвенный институт РАСХН) за оказанную помощь в проведении токсикологических экспериментов;
- к.х.н. В.И. Коробкову (каф. радиохимии химического ф-та МГУ) за помощь в проведении автордиографии;
- д.б.н. Д.Н. Маторину и д.б.н. П.С. Венедиктову (каф. биофизики биологического факультета МГУ) за оказанную помощь в организации токсикологических экспериментов и оказанную всестороннюю поддержку;
- к.х.н. Е.А. Цветковой (Институт органической химии РАН) за проведение экспериментов по выделению и фракционированию липидной фракции и обсуждение результатов;
- доц. Ф. Шмитт-Копплину (Helmholtz Zentrum München, ФРГ) и асп. Э.В. Куненкову (химический ф-т МГУ) за проведение анализов методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с Фурье преобразованием.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Давидчик В.Н., **Куликова Н.А.**, Голубева Л.И., Степанова Е.О., Королева О.В. 2008. Влияние лакказы *Coriolus hirsutus* на адсорбцию и десорбцию атразина почвами различных типов. Прикладная биохимия и микробиология, 44(6), 1-7.
2. Цветкова Е.А., **Куликова Н.А.**, Карпюк Л.А., Перминова И.В. 2007. Перспективы использования силикагеля, модифицированного гуминовыми кислотами, для очистки природных сред от липополисахаридов. Бюллетень Московского общества испытателей природы, отдел Биологический, том 12, выпуск 1, приложение 1. Биотехнология. Экология. Охрана окружающей среды, 188-194.
3. Королева О.В., **Куликова Н.А.**, Алексеева Т.Н., Степанова Е.В., Давидчик В.Н., Беляева Е.Ю. 2007. Сравнительная характеристика физико-химических свойств и биологической активности грибного меланина из *Aspergillus niger* и гуминоподных веществ, синтезируемых базидиальными грибами. Прикладная биохимия и микробиология, 43(1), 69-76.
4. **Kulikova N.A.**, Perminova I.V. 2007. Sorption-desorption of atrazine on mineral-bound humic substances related to their structure. Fresenius Environmental Bulletin, 16, 9a, 1061-1068.
5. Холодов В.А., **Куликова Н.А.**, Перминова И.В., Еремин С.А., Лебедева Г.Ф. 2005. Адсорбция гербицида ацетохлора различными типами почв. Почвоведение, 5, с. 600-607.
6. **Куликова Н.А.**, Перминова И.В., Лебедева Г.Ф. 2003. Связывание атразина гумусовыми кислотами некоторых почв. Почвоведение, 10, 1207-1212.
7. Perminova I.V., Frimmel F.H., Kudryavtsev A.V., **Kulikova N.A.**, Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S. 2003. Molecular weight characteristics of aquatic, soil, and peat humic substances as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. Environ. Sci. Technol. 37, 2477-2485.
8. **Kulikova N.A.** and Perminova I.V. 2002. Binding of atrazine to humic substances from soil, peat, and coal related to their structure. Environ. Sci. Technol., 36(17), 3720-37204.
9. Balcke G.U., **Kulikova N.A.**, Kopinke D., Perminova I.V., Hesse S., Frimmel F.H. 2002. The influence of humic substances structure on their adsorption onto kaolin clay. Soil Sci. Soc. Am. J, 66, 1805-1812.
10. **Куликова Н.А.**, Перминова И.В., Лебедева Г.Ф., Маторин Д.Н. 1997. Влияние органического вещества водной и щелочной вытяжек торфа на фотосинтез растений. Вестник Московского университета, серия 16 (Биология), 2, 36-41.

Патент:

1. Бадун Г.А. Позднякова В.Ю., Чернышева М.Г., **Куликова Н.А.**, Перминова И.В., Шмит-Копплин Ф. Способ получения меченных тритием гуминовых и гуминоподобных веществ. Патент РФ на изобретение №2295510. Приоритет изобретения от 19 декабря 2005.

Главы в монографиях:

1. **Kulikova N.A.**, Davidchik V.N., Stepanova E.V., Koroleva O.V. 2007. Enhanced adsorption of atrazine in different soils in the presence of fungal laccase. In: *Multiple Stressors: A Challenge for the Future*, Mothersill C., Mosse I., Seymour C. (Eds.). NATO Science Series IV: Science for Peace and Security, Springer, Netherlands, 391-403.
2. Perminova I.V., **Kulikova N.A.**, Zhilin D.M., Grechischeva N.Yu., Kovalevskii D.V., Lebedeva G.F., Matorin D.N., Venediktov P.S., Konstantinov A.I., Kholodov V.A., Petrosyan V.S. 2006. Mediating effects of humic substances in the contaminated environments. Concepts, results, and prospects. In: *Viable Methods of Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*. Twardowska I., Allen H.E., Haggblom M.H., Stefaniak, S. (Eds.). NATO Science Series IV: Earth and Environmental Sciences, Springer, Netherlands, 2006, Vol. 69, 249-274.
3. **Kulikova N.A.**, Stepanova E.V., Koroleva O.V. 2005. Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota. In: *Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice*, Perminova I.V., Hatfield K., Hertkorn N. (Eds.), NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences, Vol. 52, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 285-310.
4. Лебедева Г.Ф., **Куликова Н.А.**, Холодов В.А. 2002. Загрязнение почв гербицидами. В кн.: *Деградация и охрана почв*, Изд-во МГУ, Москва, 332-358.
5. Perminova I.V., Grechishcheva N. Yu., Petrosyan V.S., Anisimova M.A., **Kulikova N.A.**, Lebedeva G.F., Matorin D.N., Venediktov P.S. 2001. Impact of humic substances on the toxicity of xenobiotic organic compounds. In: *Humic Substances and Chemical Contaminants*. Hayes M.H.B., Clapp C.E., Senesi N., Bloom P.R., Jardine P.M. (Eds.), SSSA, Madison, WI., 275-287.
6. Perminova I.V., Kovalevsky D.V., Yashchenko N.Yu., Danchenko N.N., Kudryavtsev A.V., Zhilin D.M., Petrosyan V.S., **Kulikova N.A.**, Philippova O.I., Lebedeva G.F. 1996. Humic substances as natural detoxicants. In: *Humic substances and organic matter in soil and water environments: characterization, transformations and interactions*. Clapp C.E., Hayes M.H.B., Senesi N., Griffith S.M. (Eds.), St. Paul., MN, USA, 399-406.

Статьи в журналах и сборниках:

1. Kholodov V.A., **Kulikova N.A.**, Lebedeva G.F., Ilyukhina E.A., Perminova I.V. 2006. Detoxifying ability of the phenol-enriched and cross-linked humic derivatives with respect to copper. In: *Humic substances – linking structure to functions*, Frimmel F.H., Abbt-Braun G. (Eds.), Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, 825-828.
2. **Kulikova N.A.**, Badun G.A., Korobkov V.I., Pozdnyakova V.Yu., Perminova I.V. 2006. Uptake of humic acids by wheat plants: direct evidence using tritium autoradiography. In: *Humic substances – linking structure to functions*, Frimmel F.H., Abbt-Braun G. (Eds.), Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, 425-428.
3. **Kulikova N.A.**, Kholodov V.A., Lebedeva G.F., Perminova I.V. 2006. Bioassay with humics: a statistical approach to data collection. In: *Humic substances – linking*

- structure to functions, Frimmel F.H., Abbt-Braun G. (Eds.), Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, 441-444.
4. **Kulikova N.A.**, Veselovskaya M.M., Lebedeva G.F., Perminova I.V. 2006. Humic substances decrease water deficiency stress of wheat seedlings. In: Humic substances – linking structure to functions, Frimmel F.H., Abbt-Braun G. (Eds.), Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, 437-440.
 5. Маторин Д.Н., Братковская Л.Б., Осипов В.А., Алексеев А.А., **Куликова Н.А.**, Ващанов Г.А. 2006. Использование флуоресценции хлорофилла водорослей для биотестирования загрязнений водной среды. Докл. МОИП, т. 39: Биотехнология – охране окружающей среды, М. изд-во "Графикон", 116-119.
 6. Маторин Д.Н., Осипов В.А., **Куликова Н.А.**, Алексеев А.А. 2005. Биотестирование водной среды с использованием люминисценции водорослей. В: Биотехнология, Экология, Защита Окружающей среды. Садчиков А.П., Котелевцев С.В. (ред.), Москва, 71-75.
 7. **Kulikova N.A.**, Badun G.A., Perminova I.V., Pozdnyakova V.Yu., Belyaeva E.Yu., Kudryavtsev A.V. 2004. Tritium-labeled humic preparations as a perspective tool for membranotropic studies. Proceedings of the XII Int. Meeting of IHSS Humic Substances and Soil and Water Environment. Sao-Pedro, Brazil, July 25-30, 2004, 383-385.
 8. Kholodov V.A., Kovalenko A.N., **Kulikova N.A.**, Lebedeva G.F., Perminova I.V. 2004. Enhanced detoxifying ability of hydroquinones-enriched humic derivatives with respect to copper. Proceedings of the XII Int. Meeting of IHSS Humic Substances and Soil and Water Environment. Sao-Pedro, Brazil, July 25-30, 2004, 189-191.
 9. Davidchik V.N., **Kulikova N.A.**, Koroleva O.V. 2004: Laccase stabilization in the presence of coal humic acids. 2004: Proceedings of the XII Int. Meeting of IHSS Humic Substances and Soil and Water Environment. Sao-Pedro, Brazil, July 25-30, 2004, 545-546.
 10. Kholodov V.A., **Kulikova N.A.**, Perminova I.V. 2003. Adsorption of herbicide acetochlor onto kaolin-humic acids complexes. Bulgarian J. of Ecol. Sci. 2(3-4), 50-51.
 11. **Kulikova N.A.**, Dashitsyrenova A.D., Perminova I.V., Lebedeva G.F. 2003. Auxin-like activity of different fractions of coal humic acids. Bulgarian J. of Ecol. Sci. 2(3-4), 55-56.
 12. Холодов В.А., **Куликова Н.А.**, Перминова И.В., Лебедева Г.Ф. 2003. Токсичность гербицида ацетохлора в почвах различных типов. Плодородие, 5(14), 33-35.