



УДК 581.1 : 581.5+662.271.4

ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ДІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І КИСЛОТНОСТІ НА РОСЛИНИ РІПАКУ ЯК ФАКТОРІВ ВПЛИВУ СУБСТРАТІВ ҐРУНТУ ПОРОДНИХ ВІДВАЛІВ

В. Баранов¹, С. Бешлей², С. Ващук¹, С. Безносюк¹, І. Микієвич¹, З. Фецько¹

*¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: biofr@franko.lviv.ua*

*²Інститут екології Карпат НАН України, вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна
e-mail: ecoinst@mail.lviv.ua*

Вивчено зміни показників росту, вмісту пігментів фотосинтезу, пероксиду водню й активності пероксидази у проростків ріпаку при вирощуванні їх на розчинах важких металів, різної кислотності й на водних витяжках із порід ґрунту відвалу. Показано, що найбільший негативний вплив на морфофізіологічні показники проростків виявляють важкі метали, величина якого залежить від кислотності. Зниження вмісту пероксиду водню і зростання пероксидазної активності свідчить про активацію захисних механізмів у проростків ріпаку.

Ключові слова: породний відвал, проростання насіння, пігменти фотосинтезу, пероксид водню, пероксидазна активність, важкі метали, кислотність.

ВСТУП

Негативний вплив породних відвалів вугільних шахт на навколишнє середовище зумовлений одночасно великим вмістом у них важких металів (ВМ) і низьким значенням рН [3, 11]. Зокрема, це стосується відвалу Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ) у с. Сілець Львівської області [1, 2], який є негативним чинником впливу на екологічний стан довкілля [5, 7, 12]. Водні стоки з великої площі відвалу (76 га) досить значні, насичені важкими металами та мають високу кислотність, тому зменшення їхнього надходження у ґрунтові води шляхом фіторекультивациі відвалу має актуальне значення. Фіторекультивациа є найбільш економічно і екологічно вигідний засіб [6], однак потребує підбору стійких до умов відвалу рослин. Метою даної роботи була перевірка впливу важких металів і кислотності (окремо і в комплексі) на технічній олійній рослині – ріпаку, який виявив себе у цих умовах досить стійкою культурою.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Як реальний чинник токсичності субстратів відвалу використовували водні витяжки із порід у співвідношенні 1:10, в які екстрагувалися рухомі форми ВМ і які однократно мали рН відповідних субстратів ґрунту відвалу. Для перевірки ступеня токсичності окремо дії ВМ і окремо кислотності готували модельні розчини. Модельний розчин ВМ готували із 5 елементів (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe), які є домінуючими у субстратах відвалу. Вміст ВМ досить сильно відрізнявся у відібраних на глибину орного шару (25–30 см) 212 пробах зі субстратів. Тому були приготовані розчини з усередненими концентраціями ВМ (50 мг/л солі кожного елемента), а також з використанням сульфатної кислоти, яка є основним чинником кислотності на відвалі з рН 2,7 та рН 3,6. Розчин з рН 2,7 використовували як модель кислотних стоків із відвалу. Він відповідав рН води з дренажної канами біля підніжжя відвалу, а розчин з рН 3,6 як модельний середньої кислотності водних витяжок – зі зразків породи на вершині відвалу і його схилах. Аналіз морфометричних і біохімічних показників проводили на 7-му добу. Визначення вмісту пероксиду водню проводили за Di Torri [14], активність пероксидази за швидкістю окислення бензидину [4, 10].

Вміст пігментів фотосинтезу – хлорофілів і каротиноїдів визначали спектрофотометричним методом на фотометрі КФК-3 в ацетоновій витяжці у співвідношенні 1:10 після фільтрування крізь скляні фільтри Шота № 3 на довжинах хвиль 662, 644, 450 та 445 нм із обрахунком їхнього вмісту за формулами Веттштейна [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення впливу негативних чинників ґрунтів породного відвалу на ріст як основну візуальну ознаку та фізіолого-біохімічні показники проводили на проростках ріпаку. Із процесами росту пов'язаний процес фотосинтезу, який найшвидше реагує на дію стресових факторів, тому було визначено вміст пігментів фотосинтезу. За дії стресу в рослинному організмі починають утворюватись активні форми кисню (АФК), які можуть пошкоджувати практично всі структури клітини, і для нейтралізації їх дії у рослин існує антиоксидантна система (АОС), яка знешкоджує ці форми кисню [8, 15]. Для порівняльного вивчення значень токсичності дії важких металів та різної кислотності визначали вміст H_2O_2 як одного із АФК й активність ферменту антиоксидантного захисту – пероксидази [13].

З результатів табл. 1 видно, що зі збільшенням кислотності ростові процеси у ріпаку сповільнюються, а на розчинах варіантів ВМ, ВМ при рН 2,7, ВМ при рН 3,84 значення морфометричних показників знижуються більш різко, порівнюючи з контролем, причому найбільше зниження спостерігається за довжиною і масою кореня, що свідчить про функцію кореня як первинного бар'єру, який зазнає максимального впливу токсичності за дії ВМ. У вирощених на водних витяжках з червоної породи проростків ріпаку спостерігалось зростання маси і довжини пагона, корені практично не відрізнялися від контролю.

Проростки ріпаку, що росли на витяжці з чорної породи, характеризувалися зниженими морфометричними показниками порівняно з контролем у 1,5–2 рази, що було свідченням більш негативного впливу даної породи на ріст. Усі показники проростків на розчинах з рН 2,7 та у розчині ВМ з рН 2,7 були нижчими, ніж за дії лише суміші металів або дії розчину з рН 3,84. Таким чином, зі зростанням кислотності токсичний вплив ВМ зростає, і в першу чергу це проявляється на параметрах коре-

Таблиця 1. Морфометричні показники проростків ріпаку за росту на розчинах ВМ, різного рН та на витяжках із порід

Table 1. Morphometric characteristics of growing plants of colza cultured on the HM, solutions of different pH and on extracts of the rock

Варіант досліджу	Довжина пагона, см		Довжина кореня, см		Маса пагона, мг		Маса кореня, мг	
	M±m	%	M±m	%	M±m	%	M±m	%
Контроль	3,33±0,42	100	6,67±0,91	100	20,1±1,9	100	13,9±1,4	100
pH 2,7	3,27±0,47	98	2,93±0,38	44	19,7±1,5	99,9	10,3±1,2	74
pH 3,84	6,40±0,51	192	5,43±0,43	81	30,3±2,2	54	12,1±0,9	78
ВМ	1,47±0,12	44	0,33±0,02	55	12,3±0,6	62	1,7±0,8	12
ВМ + pH 2,7	1,30±0,09	39	0,13±0,01	22	9,3±0,3	47	1,0±0,1	7
ВМ + pH 3,84	1,51±0,07	45	0,30±0,02	55	12,7±0,9	65	1,3±0,1	9
Чорна порода	2,50±0,11	75	2,60±0,31	39	12,1±0,8	61	9,7±0,8	70
Сіра порода	5,37±0,47	161	5,8±0,39	87	32,7±3,1	166	12,7±0,5	91
Червона порода	5,73±0,43	172	4,83±0,32	72	37,3±2,9	189	12,3±1,1	88

невої системи. Збільшення морфометричних показників проростків ріпаку за росту на витяжках зі субстратів відвалу, порівнюючи з показниками за росту на виготовлених модельних розчинах, на наш погляд, пояснюється більшою кількістю елементів у витяжках, які викликають більший прояв явища антагонізму йонів з утворенням більш зрівноваженого і тим самим менш токсичного для рослин розчину.

Подальшим етапом було визначення вмісту фотосинтезувальних пігментів як показника стресу за дії несприятливих факторів, адже фотосинтезувальний апарат є першим, який зазнає його як прямого, так і опосередкованого впливу через утворення АФК.

Як видно з діаграми (рис. 1), вміст хлорофілу *a* знижується у всіх варіантах порівняно із контролем. Його зниження на розчинах з рН 2,7 і рН 3,8 скоріше за все спричинене його окисленням і утворенням феофітину. Максимальне зниження хлорофілу *a* у проростках спостерігалося на розчині із ВМ, і тут їхня дія могла бути

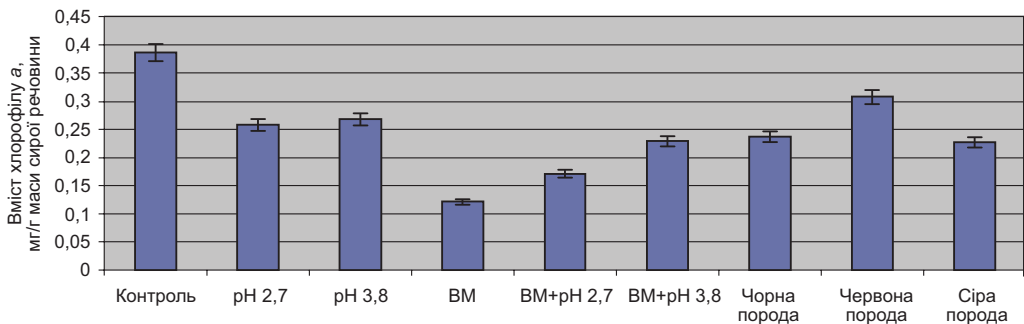
Рис. 1. Вміст хлорофілу *a* у проростках ріпаку за дії дослідних розчинів

Fig. 1. Chlorophyll A content in growing plants of colza under the action of studied solutions

подвійною: вони можуть заміщувати Mg^{2+} у порфіриновому ядрі молекули хлорофілу та впливати на його вміст, інгібуючи синтез попередників або активність ферментів, і опосередковано, шляхом інгібування росту кореня (що і спостерігалось за їхньої дії на морфометричні показники) за рахунок зменшення надходження мінеральних речовин, які необхідні для синтезу хлорофілів (Mn, S та інші). Вміст хлорофілу *b* зростав при вирощуванні проростків ріпаку на чорній породі порівняно з контролем, у всіх інших варіантах іде більше або менше зниження хлорофілу *b* (рис. 2), що свідчить про активізацію окисних процесів. За дії лише важких металів вміст хлорофілу *b* майже не змінювався, на відміну від хлорофілу *a*, обидва види кислотності зменшували його вміст, а при сумісному впливі ВМ і кислотності спостерігалася нейтралізація дії обох чинників.

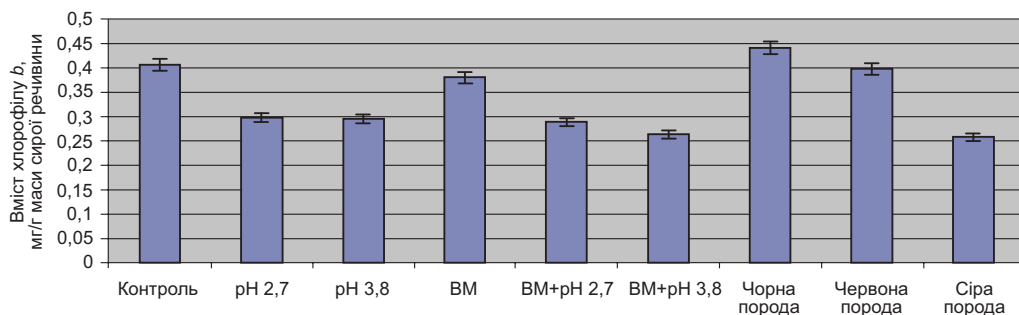


Рис. 2. Вміст хлорофілу *b* у проростках ріпаку за дії дослідних розчинів

Fig. 2. Chlorophyll B content in growing plants of colza under the action of studied solutions

Одночасно зі зниженням вмісту хлорофілів спостерігали зростання вмісту каротиноїдів – каротинів і ксантофілів у всіх варіантах досліді (рис. 3, 4). Загальновідомо, що каротиноїди є антиоксидантами, які захищають хлорофіли від фотоокислення, і зростання каротиноїдів є ознакою стійкості рослин до дії несприятливих факторів.

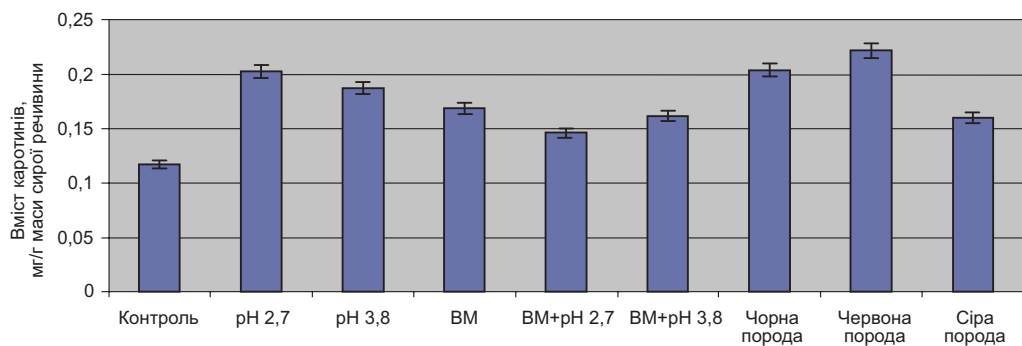


Рис. 3. Вміст каротинів у проростках ріпаку за дії дослідних розчинів

Fig. 3. Carotene content in growing plants of colza under the action of studied solutions

Дане зростання кількості каротиноїдів не може забезпечити повний захист хлорофілів, адже каротини спричиняють захист хлорофілів опосередковано, знешкоджуючи АФК, які виникають при стресі, а ВМ і кислотність можуть діяти безпосередньо на хлорофіли.

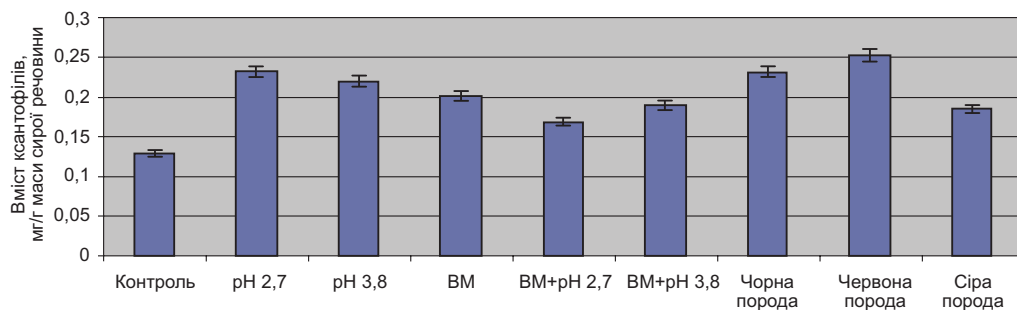


Рис. 4. Дія дослідних розчинів на вміст ксантофілів у проростках ріпаку

Fig. 4. Xanthophil content in growing plants of colza under the action of studied solutions

З літератури відомо, що віолаксантин може бути попередником інгібітора росту абсцизової кислоти [9], і зростання загального вмісту ксантофілів, можливо, відбувається за рахунок збільшення цього пігменту, а інгібування росту – за рахунок активного синтезу АБК у віолаксантиновому циклі. Співвідношення пігментів хл. *a*/хл. *b* і каротини/ксантофіли були обчислені для виявлення ознак світлолюбності чи тіньовитривалості проростків ріпаку за дії дослідних витяжок [9]. Зниження обох співвідношень пігментів у всіх варіантах свідчить про появу рис тіньовитривалості у проростків за рахунок зростання вмісту хлорофілу *b* та однаковою мірою ксантофілів *i*, вочевидь, це є захисною, адаптаційною реакцією на дію стресу, аналогічно змінам метаболізму за росту рослин в умовах низької інсоляції.

Таблиця 2. Співвідношення хлорофіл *a*/хлорофіл *b* і каротини/ксантофіли у проростках ріпаку за дії дослідних розчинів

Table 2. Ratio Chl A/Chl B and carotene/xanthophil in growing plants of colza under the action of studied solutions

Варіант	Хлорофіл <i>a</i> /хлорофіл <i>b</i>	Каротини/ксантофіли
Контроль	0,95	0,91
рН 2,7	0,86	0,87
рН 3,8	0,9	0,85
ВМ	0,32	0,84
ВМ + рН 2,7	0,59	0,86
ВМ + рН 3,8	0,87	0,85
Чорна порода	0,53	0,88
Червона порода	0,77	0,87
Сіра порода	0,88	0,86

За дії абіотичних чинників у рослин виникає окислювальний стрес, внаслідок якого відбувається надпродукція АФК, зокрема H_2O_2 , які можуть неконтрольовано реагувати з білками, ліпідами, нуклеїновими кислотами, порушуючи їх структуру і це вважається однією з ключових реакцій рослинних клітин за дії стресів [8, 13, 15]. Тому подальшим етапом нашої роботи було визначення саме цього показника. Як видно з рис. 5, спостерігалось зниження вмісту водню пероксиду в усіх варіантах, що може свідчити про активацію АОС за дії стресових чинників. Практично у чотири рази відзначено зниження H_2O_2 під час вирощування рослин ріпаку на роз-

чинах з низьким рН, ВМ і чорної породи. При сумісному впливі розчинів ВМ і рН 2,7 рівень водню пероксиду практично перебуває на рівні з контролем.

Поясненням такого зниження вмісту пероксиду водню може бути або підвищення активності окисних ферментів, або ж зниження активності фотодихання, у процесі якого утворюється якраз пероксид водню [9], що підтверджує одночасне зниження вмісту хлорофілів у досліді.

Фермент пероксидаза – один із надзвичайно функціонально лабільних ферментів, який реагує на порушення гомеостазу клітинного метаболізму за дії різноманітних стресорів [8, 13].

Активізація пероксидази у відповідь на стрес є одним із ключових процесів у формуванні та розвитку захисних реакцій у рослинних клітинах [13], зокрема і шляхом нейтралізації пероксиду водню. Про дієвість цього свідчить зростання більшою чи меншою мірою пероксидазної активності в усіх варіантах, тобто спостерігалась тією чи іншою мірою зворотна залежність із вмістом пероксиду водню, що вказує на активацію захисної системи у рослин ріпаку за дії таких несприятливих факторів середовища, як ВМ, висока кислотність і сумісна їхня дія.

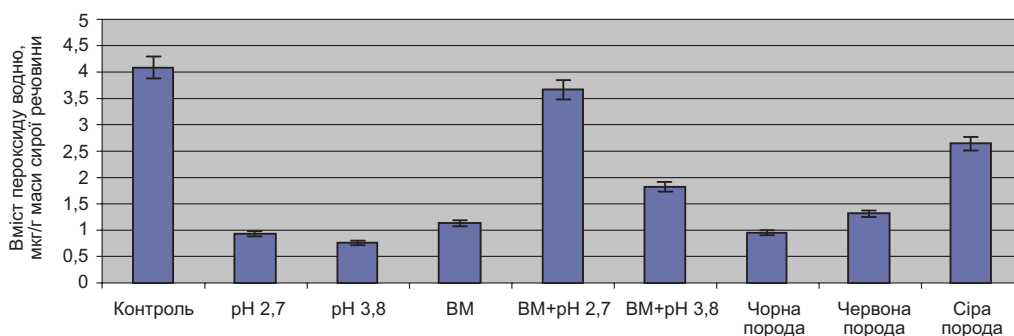


Рис. 5. Вміст пероксиду водню у проростках ріпаку за дії дослідних розчинів
Fig. 5. Content of hydrogen peroxide in growing plants of colza under the action of studied solutions

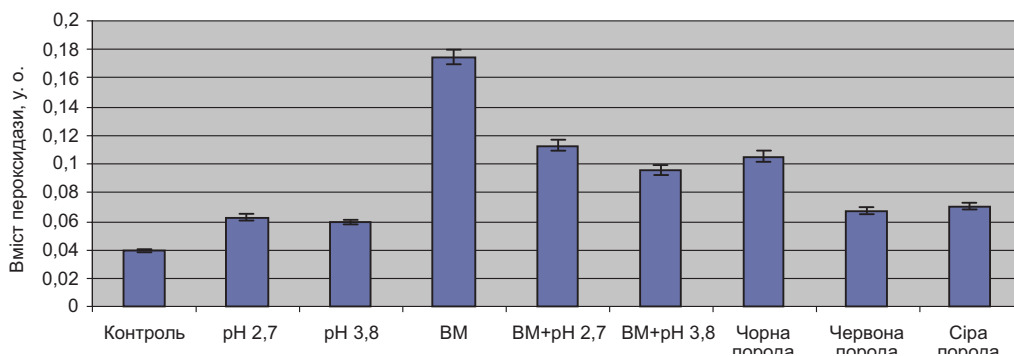


Рис. 6. Дія дослідних розчинів на активність пероксидази у проростках ріпаку
Fig. 6. Activity of peroxidase in growing plants of colza under the action of studied solutions

Найвищу пероксидазну активність спостерігали у варіанті вирощування рослин ріпаку на розчині з ВМ. Збільшення кислотності до рН 3,8 призводило до зменшення активності пероксидази, зі зміною рН від 3,8 до 2,7 активність ферменту практич-

но не змінювалася. За сумісної дії ВМ і низького рН пероксидазна активність була вищою, ніж за дії окремо лише високої кислотності, але була нижчою, ніж за дії ВМ, що може бути спричинене наближенням до оптимуму рН пероксидазної активності (висока активність пероксидази при рН від 5,0 до 7,0 обумовлена наявністю кількох молекулярних форм, котрі проявляють максимальну активність у більш вузьких межах рН). При порівнянні впливу водних витяжок із ґрунту породного відвалу можна констатувати, що найбільша пероксидазна активність проявляється на чорній породі, дещо нижча вона на червоній і сірій. Це може пояснювати значення рН водних витяжок порід: червона порода – 4,5; чорна – 3,3; сіра – 5,1 [1].

Зростання активності пероксидази в комплексі з пероксидом водню (а це і є його утилізація) могло одночасно призводити до окислення фітогормону індолілоцтової кислоти, а це, у свою чергу, могло викликати зниження інтенсивності росту проростків, що і спостерігалось у роботі.

Отже, кислотність і високий вміст важких металів виявляють негативну дію на ріст і метаболізм рослин, причому важкі метали виявляють більший вплив, ніж кислотність. Токсична дія ВМ посилюється зі збільшенням кислотності середовища.

1. Баранов В. І., Книш І. Б. Хіміко-мінералогічний склад порід відвалу вугільних шахт ЦЗФ „Львівсистеменерго” та їх вплив на проростання насіння. **Промислова ботаніка: стан та перспективи розвитку**: Матер. V Міжнар. наук. конф. Донецьк, 2007. С. 36.
2. Башуцька У. **Сукцесії рослинності породних відвалів шахт Червоноградського гірничопромислового району**. Львів: РВВ НЛТУ України, 2006. 178 с.
3. Бобровник Д. П., Болдирев Т. О., Іщенко А. М. та ін. **Львівсько-Волинський кам'яновугільний басейн**. К.: Вид-во АН УРСР, 1962. 145 с.
4. Гавриленко В.Ф., Ладьгіна М.Е., Хандобина Л.М. **Большой практикум по физиологии растений**. Москва: Высшая школа, 1975. 392 с.
5. Галушка В.П., Третяк П.Р. Екологічні проблеми шахтарського краю. В кн: **Охорона природи та раціональне природокористування. Лісівнича академія наук України. Наукові праці**, 2007; 5: 98–102.
6. Гуральчук Ж.З., Гудков І.М. Фітотремедіація та її роль в очищенні ґрунтів від важких металів та радіонуклідів. **Физиология и биохимия культ. растений**, 2005; 37(5): 371–383.
7. **Екологія Львівщини**. 2005. Львів: Сполом, 2006. 119 с.
8. Капустян А.В., Кучеренко В.П., Панют О.О., Мусієнко М.М. Активність пероксидази та зміна її ізоферментних форм за умов низькотемпературного стресу. **Физиология и биохимия культ. растений**, 2004; 36(1): 55.
9. Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. **Физиология растений**. М.: Высшая школа, 2006. 725 с.
10. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славий П.С. **Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин**. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. с. 49–50.
11. Сторожук В. М., Батлук В. А., Назарук М. М. **Промислова екологія**. Львів: Укр. академія друкарства, 2005. 547 с.
12. Трахтенберг И. **Книга о ядах и отравлениях**. Киев: Наукова думка, 200. 558 с.
13. Хавкин Э.Е., Забродина М.В. Органоспецифичные спектры пероксидаз у кукурузы. **Физиология растений**, 1995; 42(2): 281–289.
14. Di Toppi L., Lambardi M., Pazzagli L. et al. Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures. **Plant Science**, 1999; 137: 119–129.
15. Tomonori K., Reinhad P., Nobuyuki U. et al. Phenylethylamine – induced generation of reactive oxygen species and ascorbate free radicals in tobacco suspension culture: mechanism for oxidative burst mediating Ca²⁺ influx. **Plant and Cell Physiol**, 2000; 41: 1259–1266.

AFFECTING FACTORS OF SOIL OF ROCK DUMPS AT THE ACTION OF HEAVY METALS AND ACIDITY ON COLZA PLANTS

V. Baranov¹, S. Beshley², S. Vaschuk¹, S. Beznosjuk¹, I. Mykiyevych¹, Z. Fetsko¹

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: biofr@franko.lviv.ua

²Institute of Ecology of the Ukrainian Carpathians NAS of Ukraine
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine
e-mail: ecoinst@mail.lviv.ua

Indicators of growing, changes in content of photosynthetic pigments, hydrogen peroxide, and activity of peroxidase in growing plants of colza were studied regarding negative influence of and soil components of rock dumps of coal mines. It was shown that heavy metals possess the most negative influence on the morphological and physiological indicators, and their influence is increasing with elevation of acidity. Decrease in content of hydrogen peroxide and increase in the activity of peroxidase suggests the activity of protective mechanisms in the growing plants of colza.

Key words: rock dumps, coal mines, photosynthetic pigments, heavy metals, acidity, hydrogen peroxide, peroxidase activity.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И КИСЛОТНОСТИ НА РАСТЕНИЯ РАПСА КАК ФАКТОРОВ ВЛИЯНИЯ СУБСТРАТОВ ГРУНТА ПОРОДНЫХ ОТВАЛОВ

В. Баранов¹, С. Бешлей², С. Ващук¹, С. Безносюк¹, І. Микієвич¹, З. Фецько¹

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевського, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: biofr@franko.lviv.ua

²Институт экологии Карпат НАН Украины, ул. Козельницкая, 4, Львов 79026, Украина
e-mail: ecoinst@mail.lviv.ua

Изучены изменения показателей роста, содержания пигментов фотосинтеза, перекиси водорода и активности пероксидазы у проростков рапса при выращивании на растворах тяжелых металлов, разной кислотности и водных вытяжках из пород грунта отвала. Показано, что наиболее негативное влияние на морфофизиологические показатели проявляют тяжелые металлы, величина которого зависит от кислотности. Снижение содержания перекиси водорода и возрастание пероксидазной активности свидетельствует об активации защитных механизмов у проростков рапса.

Ключевые слова: породный отвал, прорастание семян, пигменты фотосинтеза, перекись водорода, пероксидазная активность, тяжелые металлы, кислотность.

Одержано: 24.02.2011