

## АСКОРБАТОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ МЕДЬЮ

*Екатерина ЕМНОВА, Павел ГРИГОРЧА\*, Валерина СЛАНИНА\*\**

*Институт генетики и физиологии растений АН Молдовы*

*\*Кафедра биологии растений*

*\*\*Институт микробиологии и биотехнологии АН Молдовы*

Rezultatele cercetărilor denotă că activitatea ascorbatoxidazică a solului prezintă un indicator sensibil al conținutului de cupru în sol și poate servi pentru biodiagnosticarea stării ecosistemului de sol.

The results of the research testify, that the ascorbic acid activity of soil is a sensitive indicator of the copper contents in soil, and can serve for diagnosis of soil ecosystem state.

Аскорбиновая кислота (АсК) широко распространена в растениях и микроорганизмах и поступает в почву с корневыми выделениями, растительными остатками или из лизированных микробных клеток [1,2]. Это одна из наиболее важных сахарных кислот, по химической природе представляющая собой  $\gamma$ -лактон гексоновой кислоты с эндиольной формой структуры при С-2 и С-3. Предшественником при синтезе АсК является свободная D-глюкуроновая кислота, образующаяся при ферментативном гидролизе УДФ-глюкуроновой кислоты. Уроновые кислоты являются компонентами многих полисахаридов [3]. Биохимические функции АсК изучены не полностью [4,5]. В клетках животных ей приписывают роль кофактора или косубстрата для гидроксилаз. Известно, что она может служить донором электронов при окислительном фосфорилировании и фотосинтезе, а также способна к комплексообразованию с металлами. Хотя АсК обладает антиоксидантными свойствами, в присутствии Fe (III) она способствует образованию свободных радикалов, высокое содержание которых может привести к неблагоприятным последствиям [4].

Восстановительные свойства АсК установлены давно: она легко окисляется в дигидроаскорбиновую кислоту (ДГАК) в присутствии следов тяжелых металлов или при участии фермента аскорбатоксидазы (КФ1.10.3.3). Аскорбатоксидаза (АсКО) является медьсодержащим ферментом, широко распространена в растениях и играет роль «конечной» оксидазы в процессе клеточного дыхания. Активность оксидоредуктаз предлагали использовать как диагностический показатель загрязнения почв органическими загрязнителями (фенолами) [6] и тяжелыми металлами (ТМ) [7]. На территории коксохимического предприятия в загрязненной фенолами почве АсКО-активность повышалась [6]. Согласно данным многочисленных исследований, загрязнение почв ТМ, как правило, приводит к угнетению их ферментативной активности. В лабораторном эксперименте [7] наблюдали снижение АсКО-активности в почвах, загрязненных Cd и Cu, однако в полевом опыте с разовым загрязнением почвы Cd и Cu в большинстве случаев АсКО-активность почв была выше по сравнению с контролем без внесения металлов. Противоречивость данных может быть обусловлена многими причинами, для выяснения которых необходимо накопление экспериментальных данных.

Целью исследования являлось изучение аскорбатоксидазной активности в почвах с естественным содержанием меди, а также с производственным и экспериментальным их загрязнением медью.

### Материалы и методы

*Эксперимент 1.* Образцы почв отбирали с модельного вегетационного опыта (сосуды, 5 кг почвы) через 45 дней культивирования растений сои (Zenit) в почве с возрастающими концентрациями меди. Почва – чернозем карбонатный с исходным общим содержанием меди 20 мг/кг. Для экспериментального разового внесения использовали хлорид меди. Схема опыта включала: контрольную почву без внесения меди и с внесением перед посевом 5, 30, 380, 580 мг элемента /кг сухой почвы.

*Эксперимент 2.* В различных районах Молдовы были отобраны образцы почв с различным содержанием меди, подтвержденным химическим анализом. В число образцов входили лесные почвы с содержанием меди ниже фонового, равного в Молдове 35 мг/кг сухой почвы, а также почвы под виноградниками с многолетней обработкой медьсодержащей бордосской жидкостью. Диапазон содержания меди в почвенных образцах составлял 12,9 – 132,6 мг меди/ кг сухой почвы (см. рис. 2). В Молдове предельно допустимая концентрация (ПДК) меди в почвах составляет 55 мг/ кг почвы [7].

Аскорбатоксидазную (АсКО) активность определяли йодатометрическим методом [8, 9]. Почву (1 г), просеянную через сито с ячейками 0,25 мм, инкубировали с 1 мл 0,2% раствора АсК в течение 1 часа при 30°C в статических условиях. Параллельно инкубировали с АсК стерильные образцы тех же проб почвы (0,5 атм – 40 мин.) и контроль на реактивы. Ферментативную реакцию прерывали добавлением в реакционную смесь 10 мл 2% раствора серной кислоты. Систему АсК/ДГАК стабилизировали добавлением ЭДТА (3 мл 0,1 н. раствора трилона Б). Смесь встряхивали и фильтровали. Объем фильтрата – 15 мл; из каждой пробы (варианта) фильтрата отбирали 2-3 повторности по 2 мл, добавляли по 3 капли 1% раствора заваренного растворимого крахмала и титровали из микробюретки (5 мл) смесью 0,001N йодат-йодид  $KJO_3 - KJ$ . (Готовили 0,01 N раствор: 0,3566 г  $KJO_3$  на 1 л дистиллированной воды +5 мл 1н. NaOH +2 г KJ). Йодат калия реагирует в кислой среде с йодистым калием с выделением йода. Йод вступает в реакцию с аскорбиновой кислотой, окисляя ее в дегидроаскорбиновую кислоту. Расчет активности проводили по формуле:  $АсКО = (С-А) \cdot 0,088 \cdot (15/2) \cdot 100 \cdot K_{\text{влажн}}$ .

С - кол-во мл 0,001 N  $KJO_3$ , пошедшего на титрование стерильной почвы; А – на титрование нативной почвы; 1 мл 0,001 N йодид-йодата эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты; 15 мл – общий объем фильтрата на взятую навеску почвы в 1 г; 2 мл – объем фильтрата, взятого для анализа. Конечный расчет на 100 г почвы поэтому умножают на 100.  $K_{\text{влажн}} = (100\% + \% \text{ влажн.}) / 100\%$ .

### Результаты и их обсуждение

В первом эксперименте основное внимание было направлено на изучение влияния меди на неферментативное окисление АсК в стерильной почве и на активность фермента АсКО, в молекуле которого содержится 4 атома меди. На рис. 1 видно, что вопреки ожиданиям высокие концентрации

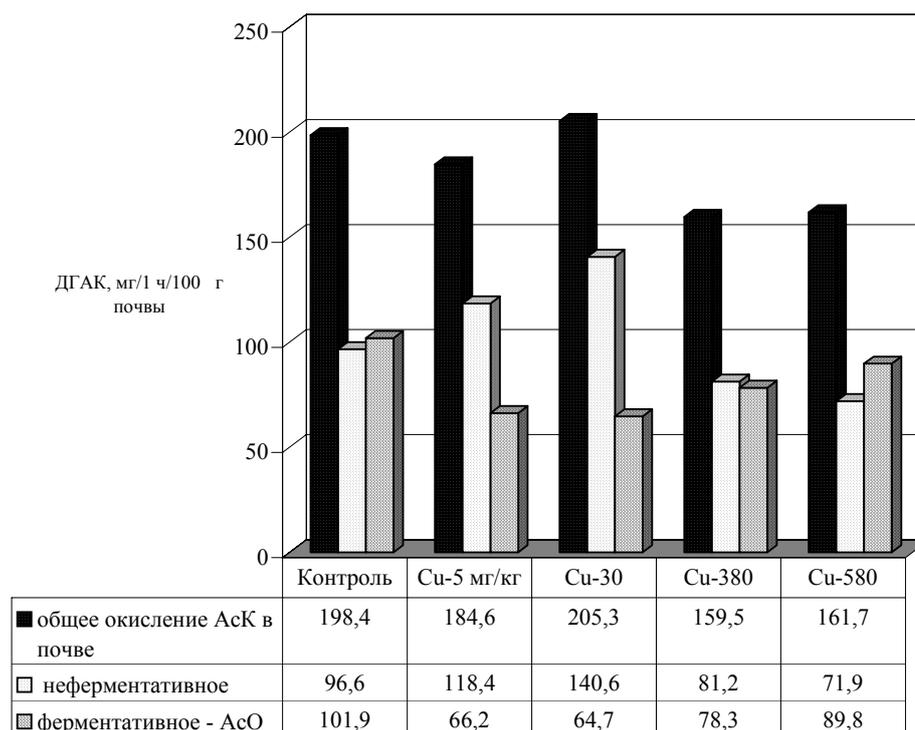


Рис. 1. Аскорбатоксидазная (АсКО) активность ризосферной почвы под соей (фаза бутонизации) после внесения меди в почву до посева

меди в почве (380 и 580 мг Cu/кг) незначительно изменяют скорость неферментативного окисления АсК. Вероятно, это связано с тем, что вносимая медь быстро связывается почвенным органическим веществом. Отмечена несколько более высокая скорость неферментативного окисления АсК в почве с внесением 5 и 30 мг Cu/кг почвы по сравнению с контролем. Можно предположить, что это связано со стимуляцией роста растений сои указанными концентрациями меди и возможным появлением в ризосферной почве большего количества окисленных соединений типа хинонов, способных окислять

АсК. АсКО-активность в почве после разового внесения всех четырех изучаемых концентраций меди достоверно снижалась ( $P < 0,05$ ), однако линейной зависимости доза-эффект не наблюдается, хотя медь входит в молекулу и необходима для активности изучаемого фермента.

Сравнение АсКО-активности в почвах с различным содержанием меди из различных районов Молдовы показано на рис. 2. Примечательно, что точкой перелома на полученной S-образной кривой является концентрация меди, равная среднему фоновому её содержанию в почвах Молдовы, то есть около 35 мг Cu /кг. При концентрациях меди выше фоновой наблюдалось значительное снижение

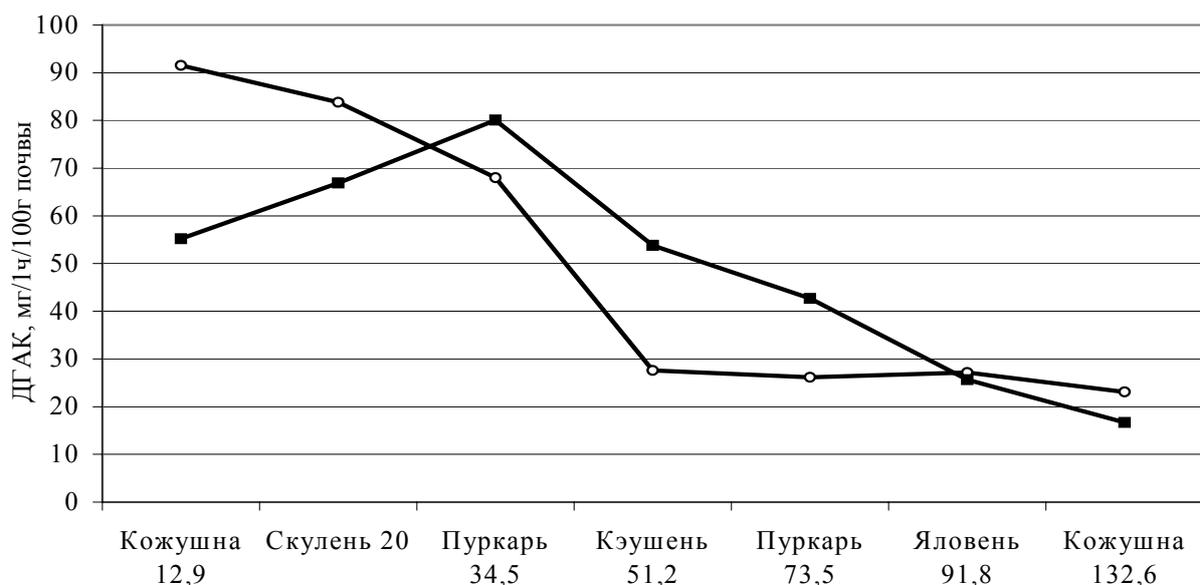
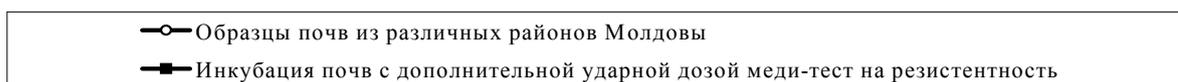


Рис. 2. Уровень аскорбатоксидазной активности в почвах с различным содержанием меди и отклик на дополнительное внесение "ударной" дозы  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (400 мг/кг)



АсКО-активности. Таким образом показано, что в лесных почвах с содержанием меди ниже фоновое (12,9-20 мг Cu /кг) активность АсКО достаточно высока, тогда как при концентрациях выше фоновой (51,2-132,6 мг Cu /кг) аскорбатоксидазная активность снижается. Аналогичная закономерность отмечена при измерении в этих же образцах скорости гидролиза диацетата флюоресцеина бактериальным сообществом, удаленным из почвы в водную суспензию с помощью ультразвука с последующим отделением почвы центрифугированием, то есть при измерении эстеразной активности [10]. Пул ферментов в образцах почв из верхних горизонтов под лесом и виноградниками создается, вероятнее всего, без участия корневых выделений, как в почве под полевыми культурами. Источниками иммобилизованных ферментов могут быть листовая опад, почвенная фауна и микробные клетки. В проведенном нами эксперименте при концентрациях меди в почвах виноградников выше ПДК, наблюдаемая АсКО-активность низка. Эти результаты согласуются с низкими значениями углерода микробной биомассы и почвенного «дыхания» в этих же почвах [10]. Очевидно, это связано с общей низкой биологической активностью почв при систематическом поступлении токсичной меди. Экспериментальный прием анализа резистентности почвенной биоты к токсическому стрессу – дополнительное внесение большой дозы металла («техногенная катастрофа») в изучаемые образцы почв [11] – выявил различную реакцию. В образцах почв с исходно низким содержанием меди отмечено снижение АсКО-активности, при концентрациях меди между 34,5-73,5 мг Cu /кг АсКО-активность повышалась, при 91,8 мг Cu /кг – оставалась на том же уровне и при 132,6 мг Cu /кг – снижалась. При низком содержании меди в почве понятно явное токсичное действие дополнительной дозы этого металла, повышение

активности АсКО может свидетельствовать о развитии толерантности в почвенной экосистеме до некоторого порогового предела, после которого система утрачивает способность к сопротивлению стрессовым воздействиям.

Таким образом, результаты наших исследований выявили негативное влияние меди на аскорбатоксидазную активность почв, если ее концентрация превышает средний фоновый уровень (35 мг/кг) этого металла в почвах республики. Заметим вновь, что ингибирование этого медьсодержащего фермента отмечается при концентрации меди в почве ниже ее установленной ПДК, равной 55 мг/кг. Токсичность меди при превышении 35 мг/кг и возникающий селективный пресс подтверждается выявлением толерантности в почвенной экосистеме до определенного порога загрязнения.

АсКО-активность почв является весьма чутким индикатором содержания меди в почве и может служить для биодиагностики состояния почвенной экосистемы.

#### **Литература:**

1. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. - Москва: Наука, 1990, с.31-32.
2. Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. - New York-Basel. Marcel Dekker Inc, 2001. - 424 p.
3. Ленинджер А. Биохимия. - Москва: Мир, 1976, с.241, 265-266, 585.
4. Мещлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке, т. 2. - Москва: Мир, 1980, гл. 10, с.441-449.
5. Кретович В.Л. Биохимия растений. -Москва: Наука, 1984. - 345 с.
6. Долгова Л.Г. Активность некоторых оксидоредуктаз как диагностический признак, характеризующий почвы, загрязненные промышленными выбросами // Почвоведение. - 1978. - №5. - С.93-98.
7. Buletin de monitoring esopedologic (agrochimic). Ediția a VII-a. - Chișinău: Agroinformreclama, 2000. - 80 p.
8. Иутинская Г.А., Серая Л.И. Аскорбатоксидазная активность почв, загрязненной медью и кадмием // Микробиологический журнал. - 1996. - Т.58. - №5. - С.12-17.
9. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. - Киев:Наукова Думка, 1976. - 334 с.
10. Corcimar S., Mereniuc Gh., Emnova E., Sașco E., Slanina V. Particularitățile microbiologice ale solului poluat cu cupru // Buletinul AȘM. Științe biol., chim. și agr. - 2004. - Nr.2(292). - P.3-8.
11. Corcimar S., Emnova E., Sașco E. Microorganisms in soils polluted and unpolluted by lead react differently on introduction of extra lead into soil // Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”. - Chișinău: CE USM, 2002, p.78-82.

*Prezentat la 23.01.2007*