УДК 574.04:633

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКОВ НА РАСТЕНИЯ

© 2009. **Алиева З.М.**
Дагестанский государственный университет

В работе проведена оценка возможности применения закономерностей ферментативной кинетики к растениям на примере редиса при изучении динамики его гибели. Отклонение теоретически прогнозируемых на основе таких закономерностей скоростей гибели проростков от полученных экспериментально составило 7.9 %, что говорит о возможности подобного подхода при оценке воздействия токсикантов на растительные объекты.

There was carry aut the estimate of ability of application the law of fermentative kinetics to the plants on the eksample of redish in this article. The deflection of theoretical forecasting the death rapid of sprout getting during the experiment is 7.9 %. It shows the ability of such method of approach in eslimating of the influense of toxic substances on to the plants.

Ключевые слова: токсиканты, биологическая кинетика, тяжелые металлы, гербициды, Raphanus sativus L.

Антропогенные воздействия на окружающую среду, вызывающие деструктивные изменения экосистем, многофакторны и разнообразны [1,2]. Достаточно напомнить о нарастающих объемах применения пестицидов, удобрений и других химикатов в сельском хозяйстве и лесоводстве, не говоря уже об участившихся аварийных выбросах загрязнителей. В связи с этим возникает необходимость разработки быстрых методов и подходов в оценке их воздействия, особенно комбинированного.

Успешное использование принципа «узкого места» для описания поведения популяций микроорганизмов с помощью кинетических зависимостей по лимитирующему «узкому» ферментативному звену [3,4] может открыть и перспективы применения этого метода для прогнозирования экологического отклика макроорганизмов на комбинированное воздействие токсикантов, выступающих в качестве ингибиторов [5-8].

В задачи работы входила проверка возможностей экстраполяции методов и подходов ферментативной кинетики, используемых в микробиологии при оценке характера и степени многофакторного ингибирования, для растений (на примере редиса Raphanus sativus L.).

Методика. Опыты проводили на модельном и чувствительном к стрессам объекте – редисе (Raphanus sativus L.) [9]. Для быстрой оценки эффекта действия токсикантов на динамику изменения численности проростков в острых опытах исследовано действие пяти сублетальных и летальных концентраций растворов (соответственно варианты 1-5): медного купороса (1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10 г/л), бихромата калия (0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 г/л), гербицида «ураган-форте» (6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 г/л), хлорамфеникола (0.05, 0.1, 0.13, 0.20, 0.25 г/л). Контроль – культивирование в воде. Растворы высоких концентраций сравниваемых веществ являются ксенобиотиками, хотя в состав некоторых из них (медный купорос, бихромат калия) входят элементы, значимые для жизнедеятельности растений. Гербицид и хлорамфеникол – ингибиторы разных звеньев метаболизма, ухудшают жизнеспособность и морфогенез растений [10]. В частности, хлорамфеникол – ингибитор синтеза белков, оказывает положительное влияние на продолжительность жизни изолированных структур растений без стимуляции их морфогенеза [11], что, возможно, связано с участием в ингибировании тканевой микрофлоры.

Продолжительность опытов по изучению выживаемости проростков не превышала 8 суток. Этот срок соответствует сохранению и использованию интактных запасов питательных веществ в семядолях, необходимых для предотвращения дефицита субстрата. Повторность опытов – 3-кратная, в каждом из вариантов – по 45-55 растений. В таблицах приведены средние значения для вариантов и их стандартные ошибки.

Полученные данные подвергали анализу, опираясь на модифицированное уравнение Моно-Иерусалимского:

$$V = \frac{V\max \times S \times Kp_1 \times \ldots \times Kp_n}{(Ks + S)(Kp_1 + P_1) \times \ldots \times (Kp_n + P_n)} - V^* \quad (1)$$

где $Kp_1,\ldots Kp_n$ - константы ингибирования токсикантов; S – субстрат; $P_1,\ldots P_n$ – концентрация ингибиторов; V*- скорость гибели при отсутствии субстрата.

Когда субстрат присутствует постоянно, как в нашем случае,

$S/(Ks + S) = 1$ и формула может быть упрощена [12]:

$$V = \frac{V\max \times Kp_1 \times \ldots \times Kp_n}{(Kp_1 + P_1) \times \ldots \times (Kp_n + P_n)} - V^* \quad (2)$$

Так как в контроле скорость роста равна нулю (число объектов не изменялось на всем протяжении опыта) и значения P равны 0, то, подставив эти значения в уравнение (2), мы получаем: V = Vmax - V* = 0; V* = Vmax.

Уравнение (2) использовалось для изучения совместного влияния четырех загрязняющих веществ. Первоначально необходимо были получить константы и максимальные скорости ингибирования для каждого токсиканта в отдельности. Для такого практического получения величин Kp и Vmax обе части формулы выразили в виде обратных величин:

$$1/V = -1/V\max \times \left(K\max/Pn + 1\right) \quad (3)$$

Согласно уравнению (3) был построен график зависимости 1/V от 1/P, выражающийся прямой линией. При этом отрезок, отсекаемый на оси ординат, соответствует величине – 1/Vmax, а соответствующий отрезок на оси абсцисс – величине -1/Kp. Максимальные скорости и коэффициенты ингибирования для каждого токсиканта определялись уже по графикам.

Далее следовала экспериментальная проверка комплексного влияния ингибиторов. На ее первом этапе ставился опыт по учету выживаемости проростков редиса для каждого из токсикантов в отдельности. На основании его результатов были получены кинетические зависимости скорости гибели, по которым определены константы и максимальные скорости ингибирования для всех токсикантов путем вычисления скорости:

$$V = (n_{i+1} - n_i)/\Delta T \quad (4)$$

где n_i и n_{i+1} – количество выживших проростков на *i* и *i+1* сут; ΔT – разница (в ч) между двумя последовательными сроками учета выживаемости и относительностью скорости гибели проростков:

$$Vотн = \frac{V}{(n_i + n_{i+1})/2} \quad (5)$$

На втором этапе из полученных раздельно для каждого токсиканта данных выбирались ряды сочетаний концентраций для оценки совместного воздействия ингибиторов. Таким путем были получены кинетические зависимости для смесей токсикантов и найдены значения констант и скоростей ингибирования этих смесей.

Для сравнения полученных экспериментальных скоростей гибели проростков с теоретически ожидаемыми вычислили стандартное отклонение [13]:

$$\sigma_y = \sqrt{1/(1-N) \times \sum d_i^2} = \sqrt{1/(1-N) \times \sum (yiэ - yit)^2} \quad (6)$$

где *d* - отклонение; y_{it} - теоретически рассчитанные, $y_{iэ}$ – экспериментально полученные значения скоростей в i-м эксперименте.

Результаты. Для анализа динамики гибели проростков редиса в растворах токсикантов для каждой концентрации подсчитывали среднее количество выживших проростков. Затем по формулам (4) и (5) рассчитывали скорость (V) и относительную скорость гибели (Vотн.). Среднюю относительную скорость гибели рассчитали как среднюю арифметическую (Vотн.ср.) между всеми Vотн., рассчитанными для данной концентрации токсиканта. Результаты, полученные для $CuSO_4$, $K_2Cr_2O_7$, гербицида «ураган» и хлорамфеникола, отражены в табл. 1. Выживаемость в контроле во всех экспериментах составляла 100%.

Таблица 1

Показатели, характеризующие изменение численности проростков при действии $CuSO_4$, $K_2Cr_2O_7$, гербицида и хлорамфеникола (А-Г)

Концентрация $K_2Cr_2O_7$, Р, г/л		Количество выживших проростков n, шт. Сроки культивирования Т,час							V отн.ср, шт/час.
		24	48	72	96	120	144	168	
1	А	50.0±0	50.0±5	50.0±0	48,0±2	45.5±2	42.0±1	-	-0,0012
	Б	50.0±0	50.0±0	50.0±0	49.2±0.8	42.8±1.4	36.6±2.3	32.0±1.0	-0,0027
	В	50.0±0	50.0±0	50.0±0	50.0±0	50.0±0	50.0±0	47.5±1.2	-0,003
	Г	50.0±0	50.0±0	47.5±1.5	47.5±1.0	35.0±2.6	20.0±3.4	14.0±1.0	-0,0067
2	А	50.0±0	50.0±0	47.5±1.0	47.5±1.0	45.0±1.4	39.5±1.0	-	-0,0016
	Б	50.0±0	45.1±0.8	42.6±1.0	42.6±1.1	37.6±1.2	32.1±2.1	28.1±0.9	-0,0034
	В	47.5±1.0	42.5±1.1	40.0±.07	40.0±0.7	35.0±2.1	20.0±1.0	17.5±1.1	-0,006
	Г	50.0±0	50±0	47.5±0.5	40.0±0.5	15.0±2.0	7.5±0.5	4.0±0.5	-0,0143
3	А	43.5±1.0	37.5±1.0	35.0±1.1	32.5±0.5	25.5±1.0	24.0±1.1	-	-0,0051
	Б	47.5±1.0	42.5±0.6	40.2±1.0	30.1±3.0	10.0±1.5	4.6±1.0	2.4±0.5	-0,0171
	В	42.5±0.5	27.5±1.0	22.5±1.1	20.0±1.0	15.0±1.5	12.5±0.9	10.0±1.0	-0,0096
	Г	50.0±0	45.0±1.0	45.0±2.0	20.0±2.4	15.0±1.1	7.5±1.5	4.0±1.0	-0,0145
4	А	39.5±1.0	35.3±1.3	30.5±1.2	27.5±1.6	24.6±0.9	22.5±1.5	-	-0,0055
	Б	40.2±2.5	30,0±	24.9±0.7	15.1±1.0	2.3±0.5	0	0	-0,0322
	В	22.5±0.5	17.5±0.3	17.5±	15.0±1.1	12.5±1.0	10.0±0.7	7.5±1.0	-0,0111
	Г	45.0±1.5	32.5±0.8	32.5±1.0	17.5±3.0	10.0±1.2	0	0	-0,0248
5	А	27.6±0.5	26.1±1.0	20.8±0.9	15.3±1.0	12.0±1.1	10.5±0.6	-	-0,0107
	Б	21.2±3.0	8.5±0.9	3.8±1.0	0	0	0	0	-0,0462
	В	17.5±2.1	7.5±2.1	2.5±1.0	0	0	0	0	-0,0498
	Г	20.0±1.0	17.5±1.1	7.5±0.8	5.0±1.0	0	0	0	-0,0351

Примечание: 1)обозначения 1-5 см. раздел «Методика» 2) величина V отн.ср. рассчитана по формулам (4), (5).

Таблица 2

Ряды сочетаний концентраций комплекса ингибиторов

№ ряда	P1 медный купорос, г/л	P2 бихромат калия, г/л	P3 гербицид «ураган», г/л	P4 хлорамфеникол, г/л
1	0,31	0,3	3,1	0,013
2	0,63	0,6	6,3	0,025
3	1,25	1,2	12,5	0,031
4	1,90	1,8	18,8	0,050
5	2,50	2,4	25,0	0,063

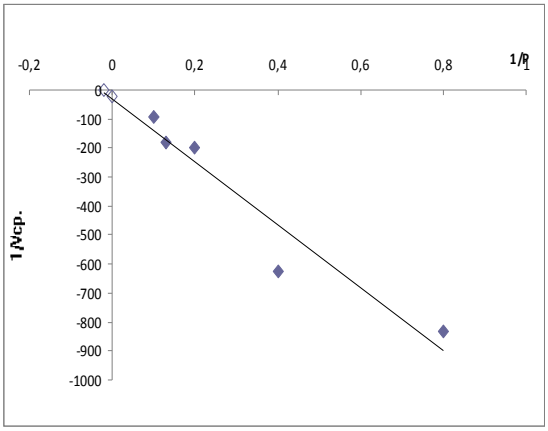
Таблица 3

Среднее количество выживших проростков при комплексном влиянии токсикантов

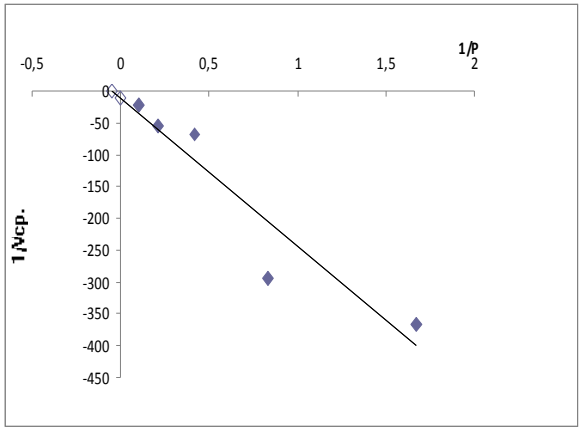
№ ряда	Сроки культивирования T,сут						$V_{эксп.}$ ср.	$V_{теор.}$ ср.
	24	48	72	96	120	144		
1	50.0±0	50.0±0	50.0±0	47.5±1.3	45.0±0.9	42.5±1.0	-0,0012	-0.0057
2	50.0±0	47..5±1.0	40.0±1.1	35.0±1.0	32.5±1.3	27.5±1.1	-0,0042	-0.0110
3	45.0±1.5	30.0±2.0	20.0±1.5	20.0±1.0	12.5±2.1	7.5±1.4	-0,0130	-0.0198
4	37.5±2.0	22..5±2.1	12..5±0.9	10.0±1.0	7.5±0.5	2.5±0.5	-0,0200	-0.0281
5	35.0±1.3	17.5±1.0	10.0±0.5	25±0.4	0	0	-0,0400	-0.0349

Примечание: обозначения 1-5 см табл.2.

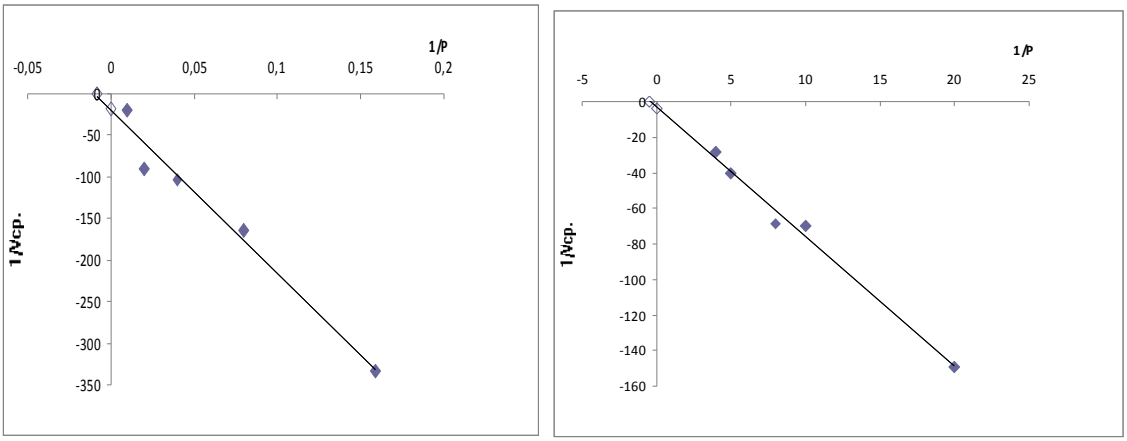
Для нахождения константы и максимальной скорости ингибирования медного купороса был построен график зависимости скорости гибели от концентрации токсиканта. Для линеаризации графика рассчитаны двойные обратные координаты. Полученная зависимость Лайнуивера-Бэрка (1/P от 1/Vср. отн.) для медного купороса представлена на рис. 1 (А). При таком подходе отрезок, отсекаемый на оси ординат, соответствовал величине 1/Vmax = -22.0, следовательно $Vmax_{CuSO4}$ = 0.045 шт/час, тогда как отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, соответствовал -1/Кр= -0.02, следовательно, $Кр_{CuSO4}$ = 50 г/л. Эти же показатели для бихромата калия составили: -1/Кр=-0.05 следовательно, $Кр_{K2Cr2O7}$ = 20 г/л, -1/Vmax = -12.0, значит Vmax = 0.083 шт/час (рис.1 (Б). Для гербицида (рис.1 (В) получено: 1/Кр=-0.0085, следовательно, Кр гербицида = 117.7 г/л, а –1/Vmax = -18.0, а Vmax = 0.056 шт/час; для хлорамфеникола: -1/Кр=-0.5, следовательно, Кр=2 г/л, а –1/Vmax=-4.0, следовательно, Vmax=0.25 шт/час (рис.1 (Г).



А – медь



Б - хром



В – «ураган» Г - хлорамфеникол

Рис. 1. Зависимость Лайнуивера-Бэрка для медного купороса (А), бихромата калия (Б), гербицида «ураган» (В) и хлорамфеникола (Г).

Таким образом, в экспериментах выявлены константы ингибирования, а также максимальные его скорости для каждого из четырех токсикантов.

На основании полученных данных путем расчетов можно предсказать и теоретическую скорость гибели проростков редиса при совместном воздействии этих токсикантов, опираясь на гипотезу «узкого места». Теоретические скорости гибели при совместном действии ингибиторов рассчитали, подставляя в формулу (2) выбранные концентрации (г/л), полученные константы и скорости ингибирования (г/л): медного купороса (Кр1 = 50), бихромата калия (Кр2 = 20), гербицида «ураган» (Кр3 = 117,7), хлорамфеникола (Кр4 = 2).

Максимальную скорость определяли как среднее значение из определенных в раздельных опытах скоростей:

$$V\max = (V\max_{CuSO_4} + V\max_{K_2Cr_2O_7}\, V\max_{ураган} + V\max_{хл})/4$$

$$V\max = (0.045 + 0.083 + 0.056 + 0.250)/4 = 0.109$$

Соответствующие значения *Vmax* подставили в формулу (2), где $Кр_1$, $Кр_2$, $Кр_3$, $Кр_4$ - константы ингибирования, найденные по графикам (рис. 1), а $P_1 - P_4$ – концентрации (табл.2) медного купороса, бихромата калия, гербицида и хлорамфеникола соответственно:

$$V = 0.109 \times 50.0/(P_1 + 50.0) \times 20.0/(P_2 + 20.0) \times 117.7(P_3 + 117.7) \times 2.0/(P_4 + 2.0) - 0.109$$

откуда имеем:

$$V_1 = 0.109(50.0/(0.31 + 50.0)20.0/(0.3 + 20.0)117.7/(3.1 + 117.7)2.0/(0.013 + 2.0) - 1 = -0.0057$$

$$V_2 = 0.109(50.0/(0{,}63 + 50.0)20.0/(0.6 + 20.0)117.7/(6.3 + 117.7)2.0/(0.025 + 2.0) - 1) = -0.0110$$

$$V_3 = 0.109(50.0/(1.25 + 50.0)20.0/(1.2 + 20.0)117.7/(12.5 + 117.7)2.0/(0.031 + 2.0) - 1) = -0.0198$$

$$V_4 = 0.109(50.0/(1.9 + 50.0)20.0/(1.8 + 20.0)117.7/(18.8 + 117.7)2.0/(0.050 + 2.0) - 1) = -0.0281$$

$$V_5 = 0.109(50.0/(2.5 + 50.0)20.0/(2.4 + 20.0)117.7/(25.0 + 117.7)2.0/(0.063 + 2.0) - 1) = -0.0349$$

Рассчитав таким образом теоретические скорости гибели для комбинированного действия токсикантов (табл. 3), провели опыт для выяснения того, насколько они совпадают с экспериментально полученными. Для проверки гипотезы проводился эксперимент по совместному влиянию четырех загрязнителей на выживаемость проростков. С учетом концентраций токсикантов в раздельных опытах был выбран ряд сочетаний концентраций для проверочного эксперимента (табл. 2).

Обработка результатов проводилась по схеме четырех предыдущих экспериментов. Экспериментально и теоретически определяемые скорости гибели проростков представлены в таблице 3. Для сравнения этих показателей по формуле (6) вычислили стандартное отклонение:

$$\sigma_y = \sqrt{1/(5-1) \times \sum (-0.0012-(-0.0057))^2 + (-0.0042-(-0.0110))^2 + (-0.0130-(0.0198))^2}$$

$$\sqrt{(-0.0200-(-0.0281))^2 + (-0.0400-(0.0349))^2} = 0.0086$$

Отклонение экспериментальных скоростей гибели от теоретически ожидаемых выразили в %: $\sigma_y/V_{max} \times 100\% = 0.0086/0.109 \times 100\% = 7.9\%$.

Таким образом, отклонение экспериментальных от теоретически ожидаемых скоростей гибели составило 7.9 %, что свидетельствует о возможности применения законов ферментативной кинетики при оценке воздействия токсикантов на растительные объекты.

Описанный подход оправдан и применительно к дафниям как тест-объекту при оценке воздействия ксенобиотиков на экосистему [14]. Реакция популяций на воздействия среды количественно можно оценить по выживаемости, скорости и интенсивности отмирания (элиминации) ее особей [15]. По этим величинам судят об экологической валентности популяций [16]. Доказательство возможности применения закономерностей ферментативной кинетики к растениям на примере редиса при изучении динамики его гибели открывает перспективы для оценки комплексного воздействия токсикантов на другие объекты и экосистемы в целом.

Библиографический список

1. *Алиев Н.К., Абдурахманов Г.М., Мунгиев А.А., Гаджиев А.А.* Экологические проблемы бассейна Каспия. – Махачкала.: Дагпресс, 1997. – 159с. **2.** *Иерусалимский Н.Д., Неронова Н.М*. Количественная зависимость между концентрацией продуктов обмена и скоростью роста микроорганизмов. – Махачкала: ДАН СССР, Т.161. N6, 1965. – С. 1437. **3.** *Корниш-Боуден Э.* Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1979. – 280 с. **4.** *Мунгиев А.А., Мунгиева М.А., Алиева З.М.* Изучение кинетики раздельного и совместного воздействия токсикантов на Daphnia magna //Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естест. науки. – 2006, №4. – С.97-99. **5.** *Пианка Э.* Эволюционная экология. – М., 1981. **6.** *Тейлор Дж.* Введение в теорию ошибок. – М.: Мир, 1985. – 272 с. **7.** *Федоров Л.А., Яблоков А.В.* Пестициды – удар по биосфере и человеку. – М., 1999. **8.** *Федорова А.И., Никольская А.Н.* Практикум по экологии и охране окружающей среды. – М.: Вдадос, 2001. – 288 с. **9.** *Чернавский Д.С., Иерусалимский Н.Д.* О принципе минимума в кинетике ферментативных реакций // Управляемый биосинтез. – М., 1966. – С. 19-24. **10.** *Швытов И.А.* Некоторые принципы математического моделирования динамики микробных популяций // Ж. общ. биол., Т.35, № 6, 1974. – С. 904-910. **11.** *Шмальгаузен И.И.* Проблемы дарвинизма. – Л.: Наука, 1969. – 464 с. **12.** *Юсуфов А.Г.* Биология старения цветковых растений. – Махачкала: Изд. ДГУ, 1992. – 201 с. **13.** *Dean A.C.K., Hinshelwood C.* Growth function and regulation in bacterial cells. Oxford, 1966. – P. 530. **14.** *Nagatani M., Shoda M., Aiba Sh*. Kinetics of product ingibition in alcohol fermentation. Part 1. Bath experiments// J. of Ferment Technol., 1968. V. 46. №3. – P. 241-248. **15.** *Nanda K.K., Bansal G.L., Kochhard V.K., Bhattacharaya N.C.* Effect of some metabolic ingibitors of oxidative phosphorylation on rooting of cuttings of Phaseolus mongo // Ann. Bot., 1978. V. 42. №. 179. – P. 659-663.