

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ  
«ДОНСКОЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ»**

Субъект РФ: Тульская область  
Номинация: «Экологический мониторинг»

**ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС ЮНЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

**«ФИТОИНДИКАЦИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В УСЛОВИЯХ  
ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ  
МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИМИ ПРОИЗВОДСТВАМИ»**

**АВТОР:** Капкова Кристина Павловна, 2 курс группа Т 21-2.1  
**НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:** Харихонов Артем Юрьевич,  
преподаватель ГПОУ ТО «Донской политехнический колледж».

Город Донской  
2022 г.

## СОДЕРЖАНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. Основные источники загрязнения города тулы.....	4
1.1 Воздействие полиметаллического загрязнения на растительность.....	5
ГЛАВА 2. Компоненты антиоксидантной системы растений.....	6
2.1 Ферменты-антиоксиданты.....	6
2.1.1 Аскорбатоксидаза.....	6
2.1.2 Каталаза.....	7
2.2 Низкомолекулярные антиоксиданты.....	7
2.2.1 Аскорбиновая кислота.....	7
2.2.2 Глутатион.....	8
ГЛАВА 3. Фотосинтетические пигменты.....	9
3.1 Хлорофиллы.....	9
3.2 Каротиноиды.....	9
ГЛАВА 4. Экспериментальная часть.....	10
4.1 Объекты исследований.....	10
4.2 Пробоотбор.....	11
4.3 Методики исследований.....	12
4.3.1 Определение активности аскорбатоксидазы.....	12
4.3.2 Определение активности каталазы.....	13
4.3.3 Определение содержания аскорбиновой кислоты.....	14
4.3.4 Определение содержания глутатиона.....	14
4.4 Результаты исследований.....	15
4.4.1 Влияние полиметаллического загрязнения на активность каталазы.....	15
4.4.2 Влияние полиметаллического загрязнения на активность аскорбатоксидазы.....	16
4.4.3 Содержание аскорбиновой кислоты в листьях в условиях загрязнения.....	17
4.4.4 Содержание глутатиона в листьях в условиях загрязнения.....	18
4.4.5 Содержание фотосинтетических пигментов в листьях кустарников в условиях полиметаллического загрязнения.....	19
4.4.6 Выявление видов биоиндикаторов.....	21
ВЫВОДЫ.....	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	24
Приложение 1.....	25

## ВВЕДЕНИЕ

В условиях города и новой климатической зоны на интродуцируемые растения действует целый комплекс неблагоприятных факторов, главными из которых являются климатические и антропогенные.

Комплексное воздействие токсикантов воздуха и почвы приводит к развитию окислительного стресса у растений. Кустарники являются важнейшим биологическим фильтром, способным поглощать аэрозольные частицы и аккумулялировать часть токсичных соединений.

**Цель работы:** исследование содержания и активности ряда компонентов антиоксидантной системы кустарников в условиях полиметаллического загрязнения санитарно-защитных зон металлургических предприятий города Тула.

В соответствии с этим были поставлены следующие *задачи*:

1. Определить:

а) содержание фотосинтетических пигментов в листьях древесной растительности в условиях полиметаллического загрязнения

б) содержание низкомолекулярных антиоксидантов: аскорбиновой кислоты и глутатиона в листьях кустарников санитарно-защитных зон предприятий и фоновой зоны

в) активность аскорбатоксидазы и каталазы

2. Выявить виды биоиндикаторы, которые могут использоваться для оценки качества среды по изучаемым параметрам.

## ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ УРБООКОСИСТЕМЫ Г.ТУЛА

Основным поставщиком загрязняющих веществ в воздушный бассейн области являются предприятия топливно-энергетической промышленности, черной и цветной металлургии, а также автотранспорт дающие от 50 до 85% загрязнителей

Загрязнение почв тяжелыми металлами, источником поступления которых являются как предприятия топливно-энергетической промышленности, черной и цветной металлургии, автомобильный и железнодорожный транспорт, так и удобрения и пестициды, приводит к уничтожению почвенной микрофлоры, потере плодородия, возникновению техногенных пустынь.

Основным источником загрязнения атмосферного воздуха является промышленность. Удельный вес выбросов в атмосферу составляет 81,6%

Основным источником выбросов хрома трехвалентного и его соединений в атмосферу является Тулачермет (рис. 1), поэтому концентрации хрома, превышающие предельно допустимые значения, отмечаются только в районе расположения предприятия и на близлежащей территории.



*Рисунок 1. ОАО «Тулачермет»*

Основными источниками выбросов оксида марганца являются Косогорский металлургический завод, Тулачермет, а также Тульский комбайновый завод и завод им. Кирова. В результате этого концентрации оксида марганца, превышающие предельно допустимые значения, отмечаются в южной части города, на большей части, территории, Пролетарского, Центрального и Привокзального районов. В Зареченском и Советском районах концентрации марганца не превышают нормы.

Основным источником загрязнения атмосферы оксидом алюминия является ОАО «Тулачермет».

Основными источниками загрязнения атмосферы в Центральном и Привокзальном районах является «Косогорский металлургический завод» (рис. 2) и автотранспорт.



*Рисунок 2. ОАО «Косогорский металлургический завод»*

### **1.1 Воздействие полиметаллического загрязнения на растительность**

Развитие растений тесно связано с условиями окружающей среды. Температуры, характерные для данного района, количество осадков, характер почв, биотические параметры и даже состояние атмосферы – все эти условия, взаимодействуя между собой, определяют характер ландшафта и виды растений являющихся его частью. Если окружающие условия изменяются, то изменяется и растительный мир.

Некрозы, уменьшение прироста, усыхание являются следствием нарушения комплекса физиологических процессов. Поступление газообразных токсикантов в листовую ткань сопровождается снижением буферной емкости. Негативное влияние поллютантов отражается не только на хлоротино-каротиновом комплексе, но и сопровождается значительными изменениями в морфологии и анатомии листа.

Токсичные газы отрицательно действуют на древесные породы не только путем прямых ожогов листьев и их уничтожения, но и путем заметного понижения их засухоустойчивости (Кулагин, 2005). Исследованиями установлено, что загрязнение среды произрастания фитотоксикантами вызывает нарушение водного обмена того же плана, что и засуха, оба эти фактора усугубляют действие каждого (Тарабрин, 1980). Некоторое повышение интенсивности транспирации вначале, затем газации, по мере все возрастающего водного дефицита постепенно снижается. В целом, реакция растений на присутствие в воздухе токсичных газов проявляется в снижении общей оводненности и водоудерживающих сил (Кулагин, Рязанцева, Спахова, 1980).

## ГЛАВА 2. КОМПОНЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ

Вредные компоненты полиметаллических выбросов предприятий, поступающие в растительный организм, вызывают широкий спектр изменений, которые можно характеризовать как стресс-индуцированные (Илькун, 1978).

В результате повышенной генерации активных форм кислорода в растении может произойти множество изменений, и самое важное - нарушение работы физиолого-биохимической машины, использующей главные жизненные компоненты - углеводы, липиды, белки, нуклеиновые кислоты (Колупаев, 2007). Изменение активности антиоксидантных систем наблюдается в ответ на действие неблагоприятных факторов среды, таких как повышение концентрации тяжелых металлов в среде и загрязнение атмосферного воздуха.

В организме кустарников имеется собственная система борьбы с излишним количеством свободных радикалов, но она ослабляется под воздействием загрязненной среды, прямых солнечных лучей и нуждается в поддержке. Было обнаружено, что многие растения содержат вещества флавоноиды – большую группу соединений с полифенольной структурой, которые связывают свободные радикалы, т.е. являются антиоксидантами. (Владимиров, 1991)

### 2.1 Ферменты - антиоксиданты

Важнейшими высокомолекулярными антиоксидантами растений, непосредственно обезвреживающими АФК, выступают специализированные ферментные системы (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и т.д.) способные тормозить или устранять свободнорадикальное окисление органических веществ, и белки, способные связывать металлы с переменной валентностью. Ферменты-антиоксиданты, обеспечивающие комплексную защиту биополимеров от АФК, расположены в различных клеточных компартментах, имеют разную субстратную специфичность и сродство с активными формами кислорода (Кения, 1993).

#### 2.1.1. Аскорбатоксидаза

Окисляет аскорбиновую кислоту в дегидроаскорбиновую. Действие этого фермента нежелательно, т.к. образующаяся кислота легко подвергается распаду, что снижает содержание витамина С в продукте.

Аскорбатоксидаза катализирует окисление *L*-аскорбиновой кислоты в дегидро-*L*-аскорбиновую кислоту в соответствии с реакцией (Рис.3).

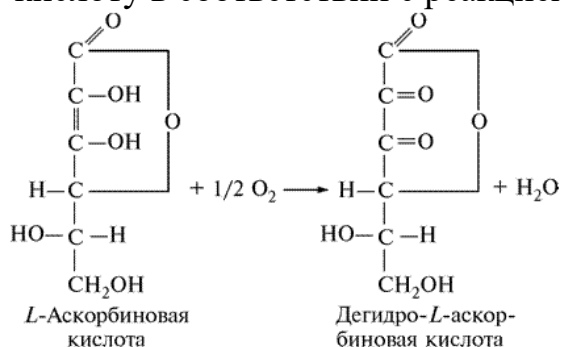


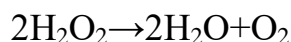
Рисунок 3. Окисление аскорбиновой кислоты

В качестве функциональной группы аскорбатоксидаза содержит медь, поэтому она чувствительна к действию агентов, ингибирующих ферменты, в частности содержащих тяжелые металлы.

### 2.1.2. Каталаза

Оксидоредуктаза с молекулярной массой около 250 кД. Это двухкомпонентный фермент, состоящий из белка соединенной с ним простетической группы, последняя содержит гематин. Установлено, что каталаза содержит 0,09% железа, т.е. 4 атома железа на 1 молекулу фермента. Оптимум действия каталазы при pH 6,5; в более кислых и щелочных средах активность уменьшается.

Каталаза катализирует дисмутацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{O}_2$ :



Процесс осуществляется в 2 этапа:

$\text{Fe}^{2+}$ -каталаза +  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$  окисленная каталаза;

окисленная каталаза +  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ -каталаза +  $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .

Один фермент способен вызывать распад  $6 \cdot 10^6$  молекул пероксида водорода в секунду

## 2.2 Низкомолекулярные антиоксиданты

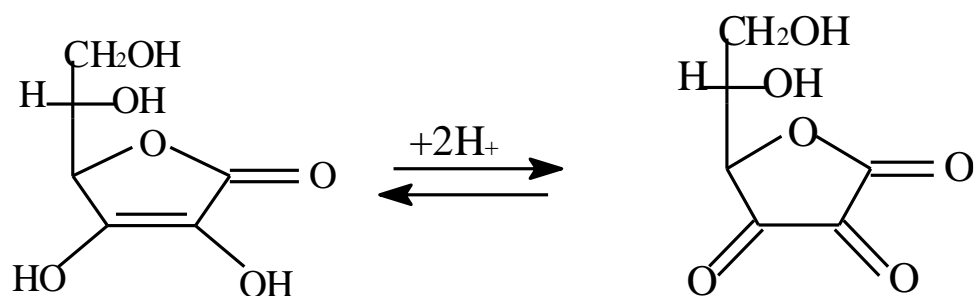
К ним относятся разнообразные соединения - глутатион, аскорбат, токоферолы, каротиноиды, полиамины, некоторые аминокислоты и др. В целом все эти вещества можно подразделить на две группы: водорастворимые антиоксиданты (гидрофильные) и антиоксиданты липидной фазы (гидрофобные) (Кения и др., 1993; Меньшикова, Зенков, 1993).

*Из водорастворимых АО* наиболее эффективными являются глутатион и аскорбиновая кислота, находящиеся в водной фазе клетки, в хлоропластах, митохондриях и других структурах, также в межмембранном пространстве клеточных органелл. Аскорбат обнаружен не только внутри клетки, но и в апопласте. Апопластный аскорбат защищает организм от повреждающего действия озона и других загрязнителей атмосферы, которые проникают в ткань листа через устьица (Чиркова, 2002).

### 2.2.1 Аскорбиновая кислота

Аскорбиновая кислота способна напрямую реагировать с супероксид- и гидроксильным радикалами, в процессе ПОЛ осуществляет регенерацию токофероксильного радикала с последующими образованиями монодегидроаскорбата и дегидроаскорбата, которые восстанавливаются в ферментативных реакциях соответствующими редуктазами.

Аскорбиновая кислота обладает сильными восстановительными свойствами. При ее окислении образуется дегидроаскорбиновая кислота (ДК) (рис. 4).



*Рисунок 4. Превращение АК в ДК*

### 2.2.2 Глутатион

Защитное действие глутатиона(GHS) связано с окислением его SH-группы, приводящим к димеризации в дисульфид. В ходе окислительного стресса количество окисленного глутатиона резко увеличивается и вслед за этим активируется синтез восстановленных форм глутатиона. Как и аскорбиновая кислота, он восстанавливает токофероксильные радикалы,  $H_2O_2$ ,  $ROOH$ , обезвреживает вторичные метаболиты окислительного обмена (Чиркова, 2002).

Глутатион является одним из самых мощных антиоксидантов, основным "сборщиком" свободных радикалов в клетках. Он является ключевым звеном трех антиоксидантных систем организма из имеющихся четырех. В антиоксидантную систему глутатиона входят три глутатионзависимых фермента: глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионредуктаза (ГР) и глутатионтрансфераза (ГТ).

## ГЛАВА 3. ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПИГМЕНТЫ

Фотосинтетические пигменты высших растений делятся на две группы - хлорофиллы и каротиноиды. Роль этих пигментов состоит в том, чтобы поглощать свет и превращать его энергию в химическую энергию. Пигменты локализованы в мембранах хлоропластов, и хлоропласты обычно располагаются в клетке так, чтобы их мембраны находились под прямым углом к источнику света, что гарантирует максимальное поглощение света (Якушина, 2005).

### 3.1 Хлорофиллы

Хлорофиллы поглощают главным образом красный и сине-фиолетовый свет. Зеленый свет они отражают и потому придают растениям характерную зеленую окраску, если только ее не маскируют другие пигменты. На рисунке 5 показаны спектры поглощения хлорофиллов а и b - для сравнения - спектр каротиноидов.

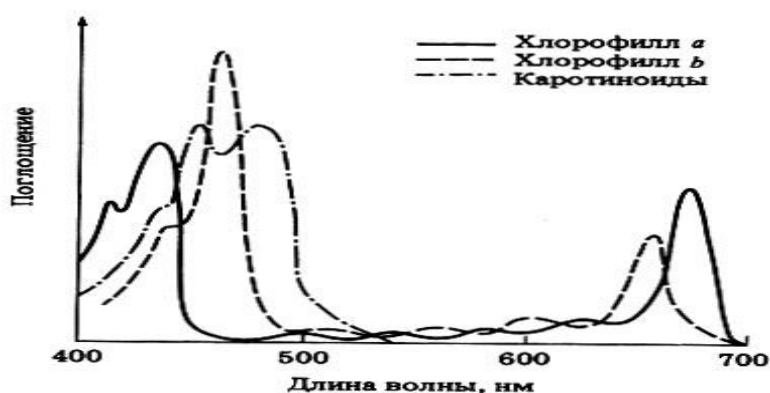


Рисунок 5. Спектры поглощения хлорофиллов а и b и каротиноидов

Для хлорофиллов характерно наличие порфиринового кольца. Такая же структура имеется и в других важных биологических соединениях - в геме гемоглобина, миоглобина и цитохромов.

### 3.2 Каротиноиды

Каротиноиды - это желтые, оранжевые, красные или коричневые пигменты, которые сильно поглощают в сине-фиолетовой области. Обычно они замаскированы зелеными хлорофиллами, но хорошо выявляются перед листопадом, так как хлорофиллы в листьях распадаются первыми.

## ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 4.1 Объекты исследований

В качестве объектов исследований были выбраны 9 кустарников интродуцентов произрастающих в санитарно-защитных насаждениях предприятий черной и цветной металлургии города Тула и условно чистой зоны (УЧЗ) (Приложение 1) – ЦПКиО им. П.П. Белоусова. Согласно анализу литературных источников изменения физиологических параметров у выбранных кустарников является более информативным и наглядным. Большинство видов произрастают в трех точках пробоотбора, и активно используются в качестве зеленых насаждений металлургических предприятий.

Объекты исследований были выбраны по принципу биоиндикационной способности:

- 1) высокое таксономическое и экологическое разнообразие (много видов в локальной экосистеме);
- 2) тесная связь с идентификационными условиями;
- 3) высокая экологическая точность реакции на изменение факторов среды;
- 4) относительно высокая численность и минимум ее флуктуации;
- 5) широкое распространение;
- 6) легкость в определении таксономической принадлежности;
- 7) наличие хорошей информации об их экологии;
- 8) функциональная важность в экосистеме.

Благодаря различным морфологическим особенностям и физиологическим свойствам древесные растения обладают определенным уровнем адаптационного потенциала, реализуемого в условиях стресса, вызванного антропогенным загрязнением (Черненко, 2002). Разнообразие ответных реакций древесных растений на воздействие компонентов промышленных выбросов свидетельствует о различных стратегиях устойчивости видов (Кулагин, 2006). В экстремальных условиях важнейшим механизмом устойчивости является активизация многоуровневой биохимической системы антиоксидантной защиты, в которую входит большое число компонентов. Среди них особое место занимают низкомолекулярные метаболиты, проявляющие антиоксидантные свойства (аскорбиновая кислота, глутатион, пролин, каротиноиды, флавоноиды и др.), и антиоксидантные ферменты (СОД, каталаза, пероксидаза) (Граскова и др., 2004).

**Карагана древовидная** или **Акация желтая** (*Caragana arborescens*) Семейство Бобовые. Род Карагана. **Ареал:** Естественно распространена в Западной Сибири, на Алтае, в Саянах, Казахстане и Монголии. ([www.flower.onego.ru](http://www.flower.onego.ru)).

**Сирень обыкновенная** (*Syringa vulgaris*) Семейство Маслиновые. Род Сирень. **Ареал:** Родина сирени обыкновенной - Балканы. Распространена на всей территории России. Растет в садах, парках и около жилья. Сирень обыкновенная предпочитает нейтральные или слабощелочные почвы с низким залеганием грунтовых вод. ([www.flower.onego.ru](http://www.flower.onego.ru)).

**Кизильник блестящий** (*Cotoneaster lucidus* Schlecht). Семейство Розоцветные. Подсемейство Яблоневые. Род Кизильник. **Ареал:** Родина этого вида - Восточная Сибирь.

Растет одиночно или группами в зарослях кустарников ([www.tsvetnik.ru](http://www.tsvetnik.ru)). Встречается по скалистым склонам в зарослях кустарника, в светлых лиственнично - смешанных лесах и по речным галечникам (Громадин и др., 2006).

**Снежноягодник белый (*Symphoricar posalbus*).** Семейство Жимолостные. Род Снежноягодник. **Ареал:** Родом снежноягодник из Северной Америки, где его ареал занимает почти всю среднюю часть материка от Тихого до Атлантического океана. Растение встречается на открытых склонах гор, в светлых лесах, по берегам рек, на сухих, каменистых почвах; широко распространен и в средней полосе России ([www.tsvetnik.ru](http://www.tsvetnik.ru)).

**Чубушник венечный (*Philadelphus coronarius*).** Семейство Гортензиевые.

**Ареал:** Россия - бассейн Амура, Китай (Манчжурия), Корея. В европейской части в культуре распространен от Архангельска, где плодоносит, но обмерзает, и С.-Петербурга до Южного берега Крыма. Зимостоек (Громадин и др., 2006).

**Дерен белый (*Cornu salba*).** Семейство Кизиловые. **Ареал:** бассейны Верхней Волги, Камы, Северной Двины и Печоры, Сибирь, Дальний Восток, Монголия, северная часть Кореи, северо-восток Китая, Япония. Растет в поймах рек, в заливных лесах и зарослях вместе с другими кустарниками.

**Пузыреплодник калинолистный (*Physocarpus opulifolius*)** Семейство – розоцветные. **Ареал:** В природе его можно встретить на территории Восточной Азии и Северной Америки. Очень декоративный листопадный кустарник семейства розоцветных высотой до 3 м.

**Боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea*).** Семейство Розоцветные. Подсемейство Яблоневые. **Ареал:** преимущественно восточнее Волги, на юг до Уральска, Западная Сибирь, Восточная Сибирь (западная и юго-западная части); северная часть; северная часть Монголии (Громадин и др., 2006). Распространён в европейской части России, Западной Сибири и Казахстане. У боярышника кроваво-красного европейско-сибирский тип ареала. ([www.flower.onego.ru](http://www.flower.onego.ru)).

**Боярышник однопестичный (*Crataegus monogina*).** Семейство Розоцветные. Подсемейство Яблоневые. Дерево от 3-6 до 12 м высоты с округло-шатровидной или широкопирамидальной, довольно симметричной кроной, нередко растущее кустообразно, особенно на пастбищах, а также в садах и парках.

#### 4.2 Пробоотбор

Пробоотбор проводился в санитарно-защитной полосе предприятий черной и цветной металлургии в первой декаде июля в период активной вегетации с листьев верхнего и среднего яруса кустарников по периферии кроны на расстоянии 1-1,5 м от поверхности земли, в период с 2019 по 2021 год. Исследования велись на свежесобранном материале в день пробоотбора. Перед анализом листья промывались дистиллированной водой.

I точка пробоотбора – ОАО «Косогорский металлургический завод» (КМЗ)

II точка пробоотбора – санитарно-защитная зона трех предприятий: ОАО СПАК «Тулачермет», «Ванадий», «Полема». Удаленность от источника выбросов составляла 100-500 м в зависимости от расположения вида в санитарно-защитных насаждениях.

Контрольные образцы отобраны в Центральном парке культуры и отдыха (ЦПКиО) им. Белоусова (III точка пробоотбора) (рис. 6). Расстояние между точками I - III - 2-3 км, II - III - 5-6 км.



Рисунок 6. ЦПКиО им. Белоусова

Почвы исследуемых участков отличались превышением ПДК по ряду тяжелых металлов (ТМ): санитарно-защитная зона СЗЗ предприятий металлургического комплекса: КМЗ- Fe, Zn, Pb; Тулачермет и Ванадий – Fe, Zn, As (Горелова и др., 2009).

### 4.3. Методики исследования

#### 4.3.1 Определение активности аскорбатоксидазы

Навеску листьев 1-2 г (в зависимости от активности фермента) помещают в фарфоровую ступку и тщательно измельчают в присутствии буферной смеси Мак-Ильвейна, pH 6. Растертую массу переносят в мерную колбу на 25 или 50 см<sup>3</sup>, доводят буфером до метки и перемешивают. В коническую колбочку на 50 см<sup>3</sup> вносят 2 см<sup>3</sup> полученной вытяжки (гомогената, центрифугата или фильтрата), содержащей фермент, и приливают 2 см<sup>3</sup> раствора аскорбиновой кислоты.

Колбы с содержимым выдерживают при температуре 25 или 30°C в течение часа. По окончании времени экспозиции реакцию прекращают, добавляя 2 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора метафосфорной кислоты. Одновременно готовят контрольные пробы. Для этого в конические колбы вносят 2 см<sup>3</sup> суспензии, 2 см<sup>3</sup> 5%-ной метафосфорной кислоты и в последнюю очередь - 2 см<sup>3</sup> аскорбиновой кислоты. Остаток неокисленной аскорбиновой кислоты титруют 0,001 н. раствором иодата (1 см<sup>3</sup> 0,001 н. КJО<sub>3</sub> равен 0,088 мг аскорбиновой кислоты). В последнем случае титрование ведут до появления синей окраски в присутствии кристаллика (5-10 мг) КJ и нескольких капелек крахмала. Активность фермента (X), выраженную в миллиграммах окисленной аскорбиновой кислоты на 1 г сырой ткани, вычисляют по формуле:

$$X = (a-b) * T * V_1/V_2 * M,$$

где a - количество см<sup>3</sup> 0,001 н. раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола (или иодата), израсходованного на титрование контрольной пробы;

v - число см<sup>3</sup> 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (или иодата), израсходованного на титрование опытной пробы;

T - титр краски (или иодата);

v1 - общий объем вытяжки; v2 - объем вытяжки, взятой для титрования; n - навеска вещества (в г).

Для пересчета на 100 мг белка производят определение белкового азота в листьях (Ермаков и др., 1972; Чупахина, 1997).

#### 4.3.2 Определение активности каталазы

**Реактивы** – 3%  $H_2O_2$ , 5 мл в 45 мл рабочего буфера

Молибдат аммония 40 г/л, экстракт 1 г на 10 мл буферного раствора – фильтруется или центрифугируется

Определение каталазы проводили по Goth, 1991. 1 г свежих листьев растирали с 10 мл буферного раствора и центрифугировали, после чего определяли оптическую плотность в кюветах шириной 0,3 см при длине волны 405 нм. Проводили опытное и контрольное определение. Опытным образцом являлся растительный экстракт (0,2 мл) в смеси с перекисью водорода (0,5 мл), буферный раствор (0,8 мл). Реакцию вытяжки и пероксида водорода проводили в течение 1 минуты, после чего добавляли молибдат аммония (0,2 мл), реакцию останавливали раствором соляной кислоты. Контролем являлась смесь буфера (0,8 мл), растительного экстракта (0,2), пероксида водорода (0,5 мл) и молибдата аммония (0,2 мл), в контроле реакцию останавливали кислотой сразу и проводили определение оптической плотности раствора. Параллельно проводили контроль на реактивы. Для этого в кюветы помещали смесь буферного раствора (1 мл), перекиси водорода (0,5 мл) и молибдата аммония (0,2 мл).

Расчет активности каталазы мкмоль  $H_2O_2$ /мл в мин. вели по формуле:

$$E_{каталазы} = \frac{D(оп) - D(к)}{D(Кр)} \times 132,2,$$

Где  $D(к)$  – оптическая плотность контрольного образца,

$D(оп)$  – оптическая плотность опытного раствора,

$D(Кр)$  – оптическая плотность контроля на реактивы.

Для пересчета активности фермента на г сырой массы умножали результат на 10.(L.Goth, 1991)

#### 4.3.3 Определение содержания аскорбиновой кислоты

2 г свежих листьев древесных растений гомогенизировали с 20 мл 5%-ного раствора метафосфорной кислоты в фарфоровой ступке. После этого полученную гомогенную массу без остатка переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили содержимое колбы до метки дистиллированной водой. После взбалтывания колбы в течение 2-3 мин гомогенат центрифугировали при 10000 гв течение 10 мин.

Для определения содержания аскорбиновой кислоты оттитровывали аликвоту (5 мл) полученного супернатанта 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДХФИФ) до слабо розового окрашивания, сохраняющегося в течение 1 минуты.

Содержание аскорбиновой кислоты (АК) и рассчитывали по следующей формуле и выражали в мг/г сырой массы:

$$c_{(АК)} = [(a * K) * 0,088 * M] / (m * n),$$

где:

$c_{(AK)}$  – содержание аскорбиновой кислоты и в растительной ткани, мг/г сырой массы;

$a$  – количество 2,6-ДХФИФ, пошедшего на титрование, мл;

$b$  – количество  $KJ O_3$ , пошедшего на титрование, мл;

$K$  – соотношение объемом  $KJ O_3$  и 2,6-ДХФИФ, израсходованных на титрование стандартного раствора аскорбиновой кислоты (в нашем опыте  $K=1,5\pm 0,02$ );

$n$  – навеска материала, г;

$M$  – общий объем экстракта, мл;

$m$  – объем аликвоты, мл;

0,088 – количество АК (мл), эквивалентное 1 мл 0,001 н раствора 2,6-ДХФИФ (Гавриленко, 2003)

#### 4.3.4 Определение содержания глутатиона

2 г свежих листьев древесных растений гомогенизировали с 20 мл 5%-ного раствора метафосфорной кислоты в фарфоровой ступке. После этого полученную гомогенную массу без остатка переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили содержимое колбы до метки дистиллированной водой. После взбалтывания колбы в течение 2-3 мин гомогенат центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин.

Для определения количества глутатиона к аликвотесупернатанта (5 мл) добавляли 2-3 капли 15%-ного раствора  $KJ$ , 5 капель 1%-ного раствора крахмала и титровали 0,001 н раствором  $KJ O_3$  до слабо синего окрашивания, сохраняющегося 1 минуту.

Содержание глутатиона (GSH) рассчитывали по следующей формуле и выражали в мг/г сырой массы:

$$c_{(GSH)} = \{[(b-a)*K]*0,307*M\}/(m*n),$$

где:

$c_{(ГЛ)}$  – глутатиона в растительной ткани, мг/г сырой массы;

$a$  – количество 2,6-ДХФИФ, пошедшего на титрование, мл;

$b$  – количество  $KJ O_3$ , пошедшего на титрование, мл;

$K$  – соотношение объемом  $KJ O_3$  и 2,6-ДХФИФ, израсходованных на титрование стандартного раствора аскорбиновой кислоты (в нашем опыте  $K=1,5\pm 0,02$ );

$n$  – навеска материала, г;

$M$  – общий объем экстракта, мл;

$m$  – объем аликвоты, мл;

0,307 – количество глутатиона (мл), эквивалентное 1 мл 0,001 н раствора  $KJ O_3$  (Гавриленко, 2003).

#### 4.3.5 Методика количественного определения фотосинтетических пигментов

Навеску 100 мг свежих листьев истирали в фарфоровой ступке, заливали 15 мл 96%-ного спирта и отфильтровывали в мерные колбы на 25 мл, доводя объем до метки добавлением 96%-ного спирта. После проводили определение содержания пигментов в вытяжке с использованием кювет с толщиной 1 см на

фотоэлектрокалориметре КФК в трехкратной повторности. Поглощение (А) снимали при следующих значениях длины волны: 665 нм, 649 нм, 470 нм.

Содержание пигментов рассчитывали по формулам (Lichtentalleretal):

$$\text{Хлорофилл } a \quad C = 13,95 * A_{665} - 6,88 * A_{649} \quad (2.1)$$

$$\text{Хлорофилл } b \quad C = 24,96 * A_{649} - 7,32 * A_{665} \quad (2.2)$$

$$\text{Каротиноиды} \quad C = \frac{1000 * A_{470} - 2,05 * A_{665} - 114,8 * A_{649}}{245} \quad (2.3)$$

Количество пигментов оценивалось в мг на 1 г сырой массы с использованием следующей формулы:

$$F = (C * V) / m$$

F – масса пигмента в 1 г сырой массы листы, мг/г;

C – концентрация пигмента, мг/мл;

V – объем вытяжки, мл;

m – масса навески листьев, г. (Гавриленко, 2003, Lichtentaller, 1983 ).

#### 4.4 Результаты исследований

##### 4.4.1 Влияние полиметаллического загрязнения на активность каталазы

Нами изучена активность одного из основных ферментов антиоксидантной системы (АОС) растений, участвующих в деактивации образующегося пероксида водорода в листьях девяти кустарников-интродуцентов, произрастающих в условиях полиметаллического загрязнения на территории двух предприятий черной и цветной металлургии г.Тулы. Полученные данные представлены на рисунке 7.



Рисунок 7. Активность каталазы в листьях кустарников санитарно-защитных насаждений предприятий металлургического комплекса г. Тулы

В контрольных образцах наибольшее содержание каталазы выявлено у кизильника блестящего, снежноягодника белого, дерна белого и боярышника однопестичного, наименьшее - у боярышника кроваво-красного, пузыреплодника калинолистного, сирени обыкновенной, снежноягодника белого.

Исследования показали неоднозначную реакцию кустарников-интродуцентов по активности фермента на полиметаллическое загрязнение почв. У ряда изученных видов (кизильник блестящий, снежноягодник белый) активность каталазы снижалась в 6-10 раз по отношению к контролю. У

боярышника кроваво-красного, боярышника однопестичного, чубушника венечного, пузыреплодника калинолистного активность фермента возрастала в условиях аэротехногенных выбросов предприятий металлургической промышленности в 1,5-4 раза. В листьях сирени обыкновенной активность фермента, напротив, снижалась в районе воздействия предприятий металлургической промышленности. Высокой активностью фермента отличались листья караганы древовидной и боярышника однопестичного (Харихонов и др., 2014).

Изменение активности фермента наблюдалось в пределах одного семейства, так у боярышника однопестичного во всех точках пробоотбора содержание каталазы превышает содержание каталазы у боярышника кроваво-красного.

#### 4.4.2 Влияние полиметаллического загрязнения на активность аскорбатоксидазы

В нейтрализации активных форм кислорода (АФК) значительная роль отводится системе скоординированных реакций антиоксидантной системы растений.

Важным фактором устойчивости растений является поддержание высокого уровня активности аскорбатоксидазы в листьях, которая помогает выйти растению из состояния окислительного стресса. Нами изучена активность аскорбатоксидазы в листьях 9 кустарников СЗН двух предприятий черной и цветной металлургии. Полученные данные представлены на рисунке 8.



Рисунок 8.. Активность аскорбатоксидазы в условиях полиметаллического загрязнения

Как показали результаты исследования, высокая активность фермента наблюдается у пузыреплодника калинолистного, снежноягодника белого, боярышника кроваво-красного, боярышника однопестичного (активность фермента увеличивается от 30 до 78 % по сравнению с условно-чистой зоной). Уменьшалась активность фермента относительно контрольной точки у сирени обыкновенной от 30 до 75% в точках II и I соответственно, чубушника венечного (на 26% по отношению к

контролю), однако уровень АК у данных видов по отношению к контрольной точке отличался незначительно по видимому у данных видов в инактивации АФК задействован не аскорбат-глутатионовый цикл. Незначительное изменение активности фермента наблюдается у дерна белого, уровень АК у него также невысок относительно контрольной зоны.

Рассматривая связь повышения активности аскорбатоксидазы с содержанием АК в листьях (табл. 2, табл. 3), следует отметить, что уменьшение содержания АК сопровождается одновременным снижением активности фермента, субстратом которого является данный антиоксидант у большинства изученных видов. Адаптацию сирени обыкновенной, караганы древовидной, чубушника вечноного, дерна белого у которых наблюдается низкий уровень активности фермента и содержания АК обеспечивает другая система защитных механизмов. При техногенном стрессе у пузыреплодника калинолистного, снежноягодника белого, боярышника кроваво-красного, боярышника однопестичного повышается уровень АК и активность аскорбатоксидазы, при снижении концентрации GHS, который, вероятно, выполняет функцию восстановления АК.

#### 4.4.3 Содержание аскорбиновой кислоты в листьях в условиях загрязнения

Нами изучено влияние полиметаллического загрязнения (выбросы предприятий металлургической промышленности) на содержание низкомолекулярных антиоксидантов: аскорбиновой кислоты в листьях 9 кустарников санитарно-защитных насаждений двух предприятий металлургической промышленности г. Тулы (СЗН). В ходе исследования выявлено, что ряд кустарников отличается более высоким исходным уровнем АК (данные по контрольной условно чистой зоне), чем ранее исследованные деревья СЗН: тополь черный, береза повислая, каштан конский, рябина обакновенная (Горелова и др. 2009, 2010; Гарифзянов и др. 2009, 2011). Полученные данные представлены на рисунке 9.



Рисунок 9. Содержание аскорбиновой кислоты в листьях изучаемых кустарников в условиях полиметаллического загрязнения

Как показали результаты исследований, уровень АК больше по отношению к контролю в листьях кустарников СЗЗ предприятий металлургической промышленности: караганы древовидной, чубушника венечного, боярышника однопестичного (от 17 до 50%). Содержание аскорбиновой кислоты снижается у пузыреплодника, кизильника, дерна белого (от 14 до 71%). У некоторых кустарников реакция компонента АОС АК на действие разных загрязнителей неоднозначна и зависит от компонентов выбросов. У боярышника кроваво-красного в точке II содержание АК падает, по-видимому реакция вида обусловлена компонентами техногенного воздействия. Напротив, содержание АК в листьях боярышника кроваво-красного на Косогорском металлургическом заводе возрастает по отношению к контролю. У сирени наблюдается обратная картина.

В целом уровень АК в листьях кустарников нестабилен и по-видимому реагирует не только на компоненты выбросов, но и на климатические условия сезона: содержание может снижаться (2010-11 гг) и увеличиваться (2012) в зависимости от климатических условий (боярышники кроваво-красный и однопестичный) (Горелова и др., 2011).

Таким образом, низкомолекулярный антиоксидант АК являются компонентом, обеспечивающим защиту от АФК у видов: карагана древовидная, чубушник венечный, боярышник однопестичный и боярышник кроваво-красный. Активно расходуется и, по-видимому, заменяются другими компонентами АОС у видов: дерен белый, кизильник блестящий, пузыреплодник калинолистный.

#### **4.4.4 Содержание глутатиона в листьях в условиях загрязнения**

Высокая концентрация токсических для биоты веществ в почве, воздухе и почвенном растворе в урбоэкосистемах приводит к развитию окислительного стресса и изменению физиолого-биохимических реакций в растениях, что может служить индикаторным признаком при исследовании состояния среды (Горелова и др., 2012). Нами изучено влияние полиметаллического загрязнения на содержание низкомолекулярного антиоксиданта: глутатиона (GSH) в листьях 9 кустарников санитарно-защитных насаждений двух предприятий металлургической промышленности г. Тулы. Полученные данные представлены на рисунке 10.

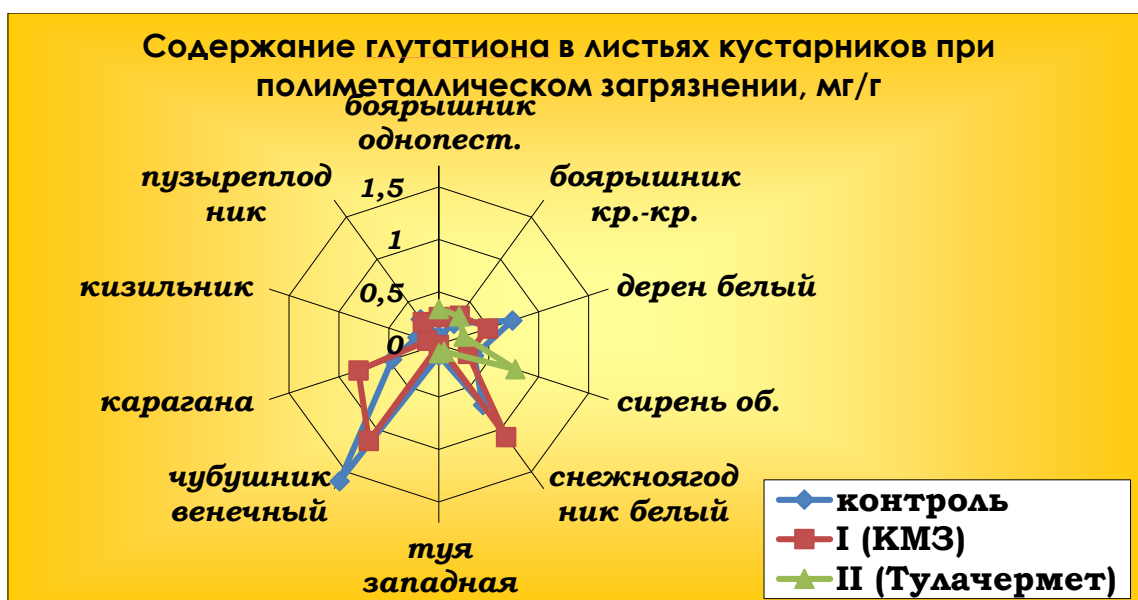


Рисунок 10. Содержание глутатиона в листьях изучаемых кустарников в условиях полиметаллического загрязнения.

Наиболее высоким содержанием GHS отличаются чубушник венечный и карагана древовидная. Уровень глутатиона в целом более подвержен изменению под влиянием техногенного загрязнения и может являться более четким маркерным признаком, чем уровень АК у таких видов, как дерен белый, кизильник блестящий, карагана древовидная.

#### 4.4.5 Содержание фотосинтетических пигментов в листьях кустарников в условиях полиметаллического загрязнения

Пигменты в условиях стресса испытывают не только прямое воздействие компонентов техногенных выбросов (образующиеся в результате растворения оксидов кислоты и соли разрушают пигменты), но и за счет интенсификации побочных фотохимических процессов, протекающих в хлоропластах под действием света – фотоингибирование, которое может быть вызвано образованием активных форм кислорода (АФК), ведущим к развитию окислительного стресса (Шевякова, 2003).

Техногенные выбросы оказывают значительное влияние на содержание и соотношение фотосинтетических пигментов в древесных растениях, изменяя количество и соотношение хлорофиллов групп а и b, увеличивая содержание каротиноидов, как одного из компонентов антиоксидантной системы (Черненко, 2002; Горелова и др., 2009; Гарифзянов, 2011). Нами было проведено исследование влияния воздействия металлургических предприятий на содержание фотосинтетических пигментов в листьях кустарников. Данные содержания пигментов приведены в таблице 1 и на рисунке 11.

Таблица 1

*Влияние металлургических предприятий на содержание хлорофиллов и каротиноидов в кустарниках санитарно-защитной полосы (г. Тула)*

Вид	Точка пробоотбора	С хл.а мг/мл	С хл.б мг/мл	a/b	∑ хлорофиллов	С каротиноидов мг/ мл
Карагана	КМЗ	8,30	4,25	1,95	12,55	3,07

древовидная	контроль	6,71	1,72	3,91	8,43	2,16
Боярышник однопестичный	КМЗ	8,67	4,20	2,3	12,87	3,22
	Тулачермет	8,17	5,75	1,87	12,55	2,98
	контроль	7,55	2,56	2,95	10,11	2,79
Боярышник крово-красный	Тулачермет	6,24	2,08	3,01	8,32	2,36
	КМЗ	6,91	2,05	3,37	8,96	2,49
	контроль	7,22	2,21	3,27	9,43	2,67
Дерен белый	КМЗ	4,14	7,18	0,58	11,32	0,59
	Тулачермет	13,92	7,18	1,94	21,09	0,85
	контроль	18,72	11,01	1,7	29,73	7,27
Сирень обыкновенная	КМЗ	4,97	2,41	2,06	7,37	1,83
	Тулачермет	4,40	2,11	2,11	6,51	1,65
	контроль	6,53	3,53	1,84	10,06	2,52
Снежнаягодник белый	КМЗ	6,97	2,90	2,40	9,87	2,57
	Тулачермет	10,85	3,69	2,94	14,54	3,93
	контроль	7,49	3,48	2,15	10,97	2,71
Кизильник блестящий	КМЗ	4,69	1,29	3,6	5,98	1,71
	контроль	2,78	0,99	2,8	3,77	1,02
Чубушник венечный	КМЗ	6,8	2,58	2,64	9,38	2,64
	контроль	7,21	3,8	1,9	11,01	2,95



Рисунок 11. Содержание хлорофиллов и каротиноидов в условиях полиметаллического загрязнения

Содержание пигментов в кустарниках в условиях полиметаллического загрязнения колеблется для хлорофиллов а - от 2,78 мг/мл (кизильник блестящий)-8,67 мг/мл (боярышник однопестичный), для хлорофиллов b - от 0,99 мг/мл(кизильник блестящий) до 5,75мг/мл(боярышник однопестичный). Соотношение хлорофиллов а/в приближено к среднему (3/1) в опытных точках у кизильника блестящего и боярышника однопестичного.

Для таких видов как боярышник однопестичный, кизильник блестящий карагана древовидная и снежноягодник белый при воздействии полиметаллических выбросов происходит увеличение содержания хлорофилла b, что не соответствует описанным в литературе данным для деревьев (Черненкова,2002; Горелова и др., 2009).

#### 4.4.6 Выявление видов биоиндикаторов

В последнее время актуальным является вопрос об использовании различных видов растений для биоиндикации качества окружающей среды. Проведенные нами исследования физиологических параметров позволяют выделить виды, которые можно использовать для фитоиндикации и фитотестирования окружающей среды. Полученные нами данные о физиологических изменениях в листьях кустарников санитарно-защитной полосы металлургических предприятий с превышением ПДК по металлам в почвах обобщены и собраны в таблице 2.

Таблица 2

*Изменение физиологических параметров кустарников в условиях полиметаллического загрязнения*

Вид	Точка пробоотбора	AK(%)	GHS(%)	AO(%)	KAT(%)
Боярышник кроваво-красный	I	26	17	78	53
	II	21	15	19	33
Боярышник однопестичный	I	17	70	42	69
	II	31	77	77	50
Сирень обыкновенная	I	16	18	75	45
	II	4	65	30	16
Карагана древовидная	I	50	50	25	40
Кизильник блестящий	I	20	43	98	99
Чубушник венечный	I	20	30	26	46
Дерен белый	I	31	70	11	99
	II	71	85	28	97
Снежноягодник белый	I	12	45	44	90
	II	99	89	46	63
Пузыреплодник калинолистный	I	14	14	48	50

Из приведенных данных (табл. 6) следует, что компоненты выбросов предприятий черной и цветной металлургии оказывают токсическое действие практически на все виды кустарников СЗЗ. Таким образом, изменение физиологических параметров кустарников проявляется в различной форме и зависит от компонентов техногенной нагрузки. Из проведенных исследований можно выявить следующие виды биоиндикаторы:

1. По всем изучаемым физиологическим параметрам: боярышник кроваво-красный и боярышник однопестичный, снежноягодник белый - увеличивается активность изученных компонентов АОС при полиметаллическом загрязнении

2. По содержанию низкомолекулярного антиоксиданта АК карагана древовидная и чубушник венечный - увеличение синтеза низкомолекулярного антиоксиданта АК в условиях техногенного стресса, вызванного повышением концентрации ТМ в окружающей среде.

3. По снижению уровня активности каталазы от 40 до 90 % - виды карагана древовидная, кизильник блестящий, дерен белый, снежноягодник белый, пузыреплодник калинолистный, сирень обыкновенная.

В качестве биоиндикационного и мониторингового параметра из изученных рекомендуем использовать уровень активности каталазы в листьях.

## ВЫВОДЫ

В проведенных нами исследованиях **определили:**

1. Увеличение содержания фотосинтетических пигментов в диапазоне от 20 до 46 % в листьях древесной растительности в условиях полиметаллического загрязнения.

2. Увеличение уровня содержания каротиноидов в условиях полиметаллического загрязнения у видов: карагана древовидная, кизильник блестящий и боярышник однопестичный в диапазоне от 14-41%, снижение уровня у видов: дерен белый и снежноягодник белый от 16 до 92 % относительно контрольной точки.

3. Активность аскорбатоксидазы напрямую зависит от синтеза аскорбиновой кислоты и повышается у видов: боярышник кроваво-красный, боярышник однопестичный, карагана древовидная, чубушник венечный на 40-80% в условиях техногенной нагрузки относительно условно чистой зоны. Активность фермента каталазы обеспечивает антиоксидантную защиту при воздействии техногенных выбросов предприятий металлургической промышленности у видов: боярышник кроваво-красный и однопестичный, чубушник венечный.

В проведенных исследованиях **выявили** следующие виды биоиндикаторы: по всем изученным физиологическим параметрам: боярышник кроваво-красный, боярышник однопестичный. Уровень каталазы может являться физиологическим параметром для фитоиндикации у большинства изученных видов: дерен белый, сирень обыкновенная, кизильник блестящий, пузыреплодник калинолистный, карагана древовидная, снежноягодник белый.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горелова, С.В. Биоаккумуляция тяжелых металлов древесными растениями и оценка возможности их использования для биоиндикации воздействия компонентов выбросов предприятий металлургической промышленности [Текст] / Горелова С.В., Гарифзянов А.Р., Ляпунов С.М., Горбунов А.В., Окина О.И., Фронтасьева М.В. // Проблемы биогеохимии и геохимической экологии, 2010 № 1 (12). – С. 155-163.

2. Горелова, С.В. Оценка возможности использования древесных растений для биоиндикации и биомониторинга выбросов предприятий металлургической промышленности [Текст]. / С.В. Горелова, А.Р. Гарифзянов, С.М. Ляпунов, А.В. Горбунов, О.И. Окина, М.В. Фронтасьева // Проблемы биогеохимии и химической экологии – 2010 - №1 (12). – С. 155-163.

3. Граскова, И.А. Изменение активности пероксидазы при патогенезе кольцевой гнили картофеля / И.А. Граскова, А.С. Романенко, С.В. Владимирова, А.В. Колесниченко // Физиология растений, 2004. №4. - С.529-533.

4. Горелова, С.В. Компоненты аскорбат-глутатионового цикла древесных интродуцентов в условиях техногенного стресса [Текст] / С.В. Горелова. Е.В. Меньшикова, А.Ю. Харихонов // Материалы Всероссийской научной конференции - Иркутск: СИФИБР СО РАН, 2013. -С.504

5. Горелова, С.В. Низкомолекулярные антиоксиданты: аскорбиновая кислота и глутатион в листьях кустарников в условиях полиметаллического загрязнения [Текст] / С.В. Горелова, А.Ю. Харихонов, Е.В. Меньшикова // 17-я Международная Пущинская школа конференция молодых ученых. Сборник тезисов. 2013.- С.494

6. Горелова, С.В. Фотосинтетические пигменты древесных интродуцентов при интенсивной техногенной нагрузке в городских [Текст] / Е.В. Меньшикова, С.В. Горелова, А.Ю. Харихонов // 17-я Международная Пущинская школа конференция молодых ученых. Сборник тезисов. 2013.-С.520



*Карагана древовидная*



*Сирень обыкновенная*



*Кизильник блестящий*



*Снежноягодник белый*



*Чубушник венечный*



*Дерен белый*



*Пузыреплодник*



*Боярышник кр.-красный*



*Боярышник однопестичный*