

И. К. Проскурина, К. Е. Гусева, А. Е. Агапова

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В МОДЕЛЬНОЙ ВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЕ

Исследования влияния различных химических соединений на биологические молекулы, в том числе на ферменты, весьма актуальны в настоящее время, поскольку они дают возможность выявить новые тест-функции для мониторинга окружающей среды.

Большое количество работ посвящено изучению влияния соединений тяжелых металлов на живые организмы растительного и животного происхождения [1, 8, 9, 12]. В меньшей степени в литературе представлены данные о влиянии органических соединений [8].

Целью данной работы явилось исследование влияния фенола и N,N'-диметилмочевины на активность каталазы элодеи канадской, содержащейся в модельном водоеме.

Каталаза (КФ 1.11.1.7) – весьма распространенный фермент, она находится почти во всех аэробно дышащих клетках и у некоторых факультативных анаэробов. Функция каталазы заключается в защите организма от активных кислородсодержащих радикалов и пероксида водорода [5,7]. Активность каталазы весьма различна не только в разных организмах одного и того же вида или разновидности, но и у одного и того же организма в различных его органах в зависимости от возраста или стадии развития, от физиологического состояния и от многих других причин. Исследования показали, что отклонения от среднестатистического значения в активности каталазы могут достигать до 250%. Эти данные показывают, с какой осторожностью надлежит относиться к выводам об активности каталазы в зависимости от вида и рода живого организма или от внешнего воздействия [7]. Вот почему исследования влияния каких-либо токсикантов на активность каталазы целесообразно проводить в модельной экосистеме, это позволит исключить влияние других факторов

на активность исследуемого фермента и перенести полученные результаты на естественные водоемы.

Моделирование экологических процессов и проведение эколого-биохимических исследований включает в себя разработку моделей для понимания, предсказания и оценки нынешних и вероятных будущих воздействий и реагирования экосистем на множество стрессов на разных уровнях. Модельная экосистема позволяет имитировать поведение системы или ее компонентов при заданных условиях, не прибегая к проведению эксперимента над всей системой и обеспечивая сохранение внешних условий, близких к естественным, а также позволяет формировать требуемые начальные и текущие условия эксперимента и эффективный контроль в течение заданного промежутка времени [3, 6, 13].

Созданная нами модель водной экосистемы включает элементы концептуальной и имитационных моделей. Имитационные модели – это уменьшенные копии отдельных подсистем; концептуальные модели представляют собой блок-схемы воздействия тех или иных подсистем в пределах более широких систем. Каждая модель должна иметь постоянные факторы и ряд переменных. Для модели водной экосистемы такими переменными могут быть объем воды, концентрация кислорода, температура и pH воды, количество водных организмов, содержание химических соединений. Предпочтительно, чтобы модель включала 2 переменных фактора. Используемая в нашем эксперименте модель включает следующие факторы: а) постоянные – общий объем воды (9 л), прозрачность воды, количество и состав грунта (0,5 кг), температурный режим (18-19 °С), освещенность, количество растений;

б) переменные – концентрация токсиканта – фенола или N,N'-диметил-мочевина, время воздействия токсиканта.

Важной составляющей в работе с биологическими моделями является статистический метод обработки полученных данных, так как исследователь всегда имеет дело с конкретной особью, у которой видовые качества в какой-то мере маскируются индивидуальными особенностями, связанными с его функциональными свойствами, – это индивидуальные отклонения в ту или иную сторону от «видового усреднения». Поэтому для исключения индивидуальных отклонений и выявления общих закономерностей все эксперименты были выполнены в 3-х биологических и 5-7 аналитических последовательностях.

Методы исследования

В качестве исходного материала для исследований использовался экстракт стеблей и листьев элодеи канадской, взятой из прудов Петропавловского парка г. Ярославля. Экстракт приготавливали путем гомогенизации 0,5 г листьев и стеблей элодеи с небольшим количеством кварца и дистиллированной воды. Затем полученную массу переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Экстракт немедленно фильтровали и использовали для исследований.

Активность каталазы определяли колориметрическим методом [4]. Принцип метода основан на способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. В опыте использовались холостая, контрольная и опытная пробы. В каждую пробу вносили 1 мл трис-НСI буфера рН=7,8, в холостую и опытные – по 2 мл пероксида водорода, а в контрольную – 2 мл дистиллированной воды; в контроль-

ную и опытные пробы затем прибавляли по 0,1 мл экстракта элодеи канадской. Реакцию останавливали через 10 минут добавлением 1 мл 4%-ного раствора молибдата аммония во все пробирки, после этого в холостую пробу приливали 0,1 мл экстракта. Интенсивность окраски в каждой пробе измеряли на ФЭКе при длине волны 410 нм против контрольной пробы. Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$E = (A_{хол} - A_{оп}) * V * t * K$, где

E – активность каталазы (мкат/мл);

Aхол и Aоп – экстинкция холостой и опытной проб;

V – (0,1 мл) объем вносимой пробы;

t – время инкубации;

K – коэффициент миллимолярной экстинкции H₂O₂ ($22,2 * 10^3 \text{ мм}^{-1} * \text{см}^{-1}$)

В эксперименте использовались различные концентрации токсикантов: фенола – 1, 5, 10, 20 ПДК – [1 ПДК = 0,001 мг/л]; N,N'- диметилмочевина – 1, 5, 10, 20 ПДК (по данным ПДК мочевины) – [1 ПДК = 0,001 мг/л]. Выбор концентрации токсикантов не был случайным. Онованием служили данные ГорСЭС 2001 г. по содержанию фенола в реке Волга (3 ПДК) и в реке Которосль (6 ПДК) в черте города.

Результаты исследований

Исследования проводились в период май-июнь и сентябрь-ноябрь 2000-2002 гг.

Определение активности каталазы элодеи канадской в отсутствие токсиканта показало сезонные изменения: так, в летний период активность составляла 22200 ± 890 мкат/мл., а в осенний – 33300 ± 2000 мкат/мл., то есть осенью активность каталазы на 30% выше. Вероятно, повышение активности каталазы в осенний период связано с накоплением за период вегетации перекисных соединений.

До изучения влияния токсикантов на активность каталазы интересно было исследовать изменение активности фермента во времени при содержании элодеи канадской в искусственном водоеме. Измерение активности проводили в течение 20 суток через каждые 2-е суток. Эти эксперименты показали, что активность исследованного фермента не изменяется

на протяжении восьми суток, а затем плавно начинает расти (рис. 1). На 15-е сутки наблюдается увеличение активности в 1,25 раза по сравнению с первыми сутками. Поэтому исследование влияния токсикантов проводили в течение восьми суток с тем, чтобы исключить естественные временные изменения активности каталазы.

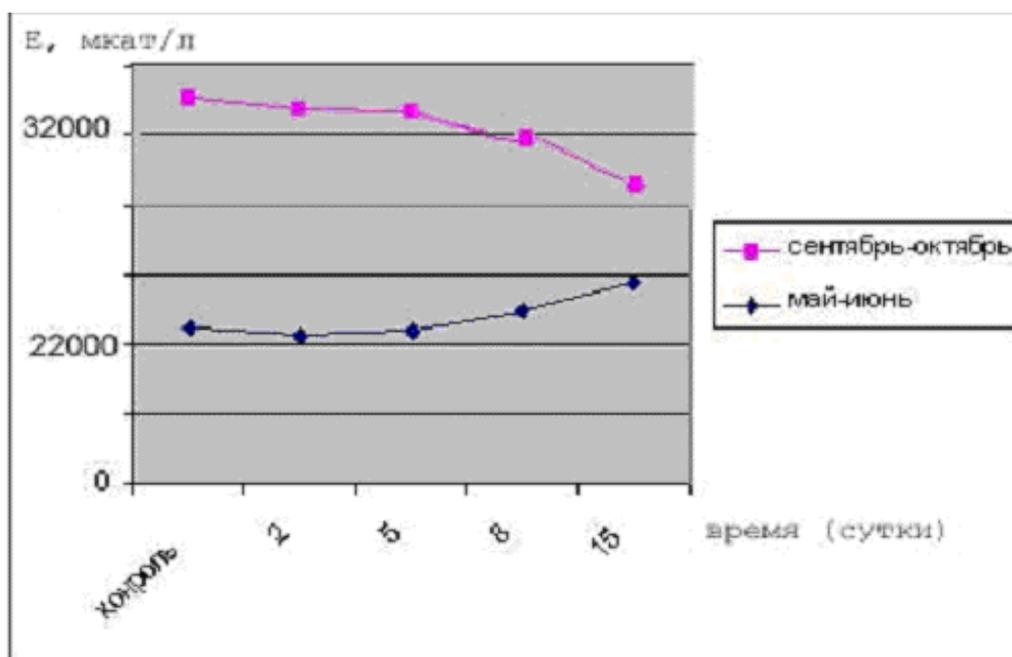


Рис. 1. Сезонные изменения активности каталазы элодеи канадской (при содержании в чистом модельном водоеме)

Исследование влияние фенола в разных концентрациях на активность каталазы элодеи канадской (табл.1) показало, что активность исследуемого фермента не изменяется при воздействии токсиканта в концентрации 1 ПДК, что и следовало ожидать, так как ПДК – это предельно допустимая концентрация вещества, не оказывающая какого-либо вредного воздействия на организм.

При воздействии фенола в концентрации 5 ПДК происходит незначительное падение активности каталазы на 2-е (18%) и 5-е (5%) сутки и снижение активности фермента (более 35%) на 8-е сутки содержания растения в загрязненном фенолом водоеме.

Резкие колебания активности каталазы наблюдаются при воздействии фенола в концентрации 10 ПДК. По истечении 2-х суток воздействия фенола активность ка-

талазы падает почти в 2,5 раза, на 5-е сутки, напротив, увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем, а на 8-е сутки вновь падает ниже значения контрольной пробы. Исследование воздействия фенола в концентрации 20 ПДК показало, что активность каталазы сначала возрастает на 20%, а потом постепенно падает. Такие изменения активности каталазы еще раз подтверждают данные о сложности взаимодействия фенола с растениями [2]. Как было ранее установлено [10, 11], фенольные соединения реагируют с растениями быстро, однако они химически неустойчивы и разлагаются в водной среде путем прямого окисления или с участием фенолоксидаз растительного происхождения. Промежуточные продукты окисления фенолов – хиноны – имеют высокую реакционную способность и могут рассматриваться как вторичные токсины.

В нашем исследовании, вероятно, на 5-е сутки воздействия фенола в концентрации 10 ПДК происходит накопление перекисных соединений, что приводит к увеличению активности каталазы, даль-

нейшее содержание элодеи в загрязненном водоеме ведет к истощению резервов растения, что приводит к его гибели на 20-е сутки.

Таблица 1

Активность каталазы элодеи канадской при воздействии фенола

Концентрация N,N'- диметилмочевины	Активность каталазы (мкат/л) при воздействии фенола			
	контроль	2-е сутки	5-е сутки	8-е сутки
1 ПДК	22200±900	22200±900	22300±1000	22500±4000
5 ПДК	22200±900	18200±1170	21300±760	14600±1300
10ПДК	22200±900	9800±430	45730±900	20400±900
20ПДК	22200±900	27000±1170	21000±700	19500±440

Результаты исследования активности каталазы элодеи канадской в случае загрязнения модельного водоема N,N'- диме-

тилмочевины в концентрации 1, 5, 10 и 20 ПДК представлены в табл. 2.

Таблица 2

Активность каталазы элодеи канадской при воздействии N, N' - диметилмочевины

Концентрация N,N'- диметилмочевины	Активность каталазы (мкат/мл)			
	контроль	2-е сутки	5-е сутки	8-е сутки
1 ПДК	33300±750	33300±400	32200±400	33100±550
5 ПДК	33300±750	31100±1400	16400±1200	14700±900
10ПДК	33300±750	28100±1200	26600±1500	17300±1700
20ПДК	33300±750	25700±900	22600±1500	11500±1200

Как видно из представленных данных, N,N'-диметилмочевина в концентрации 1 ПДК не оказывает влияния на активность исследуемого фермента (рис.2). При воздействии токсиканта в концентрации 5, 10 и 20 ПДК наблюдается понижение активности каталазы во времени. Такое падение активности фермента может быть вызвано двумя причинами: либо NN-диметилмочевина снижает синтез белка в элодее, либо продукты метаболизма токсиканта *in vivo* ингибируют каталазу.

Сравнивая результаты, полученные при загрязнении модельного водоема фенолом и N,N'-диметилмочевинной, можно констатировать, что выбранные токсиканты оказывают разное действие на активность каталазы элодеи канадской, что позволяет сделать заключение о разных механизмах воздействия выбранных токсикантов и их метаболитов на каталазу элодеи канадской.

Библиографический список

1. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // СОЖ. 1998. №5. С. 238.
2. Ганочкин Л.Д., Плеханов С.Е., Баттах М., Максимов В.Н. Адаптационно-токсикологические аспекты комбинированного действия фенола, меди и кадмия на зеленые микроводоросли // Вестник Московского университета, сер. Биология. 1995. №3. С. 41.
3. Гурман В.И., Дыхта Д.И. Эколого-экономические системы: модели, информация. Новосибирск: Наука, 1987. С. 80-123.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова Н.О., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. №1. С. 16.
5. Краткая химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1963. С. 455-456.
6. Мизинцев В.П. Применение моделей и методов моделирования в дидактике. М.: Знание, 1977. С. 4-7, 26-31.
7. Михлин Д.М. Биохимия клеточного дыхания. М.: АН СССР, 1960. С. 246-260.
8. Пурмаль А.П. Антропогенная токсикация планеты // СОЖ, 1998. №9. С. 39-52.
9. Ровинский Ф.Я. Методы анализа загрязнения окружающей среды: токсичные металлы и радионуклиды. М.: Атомиздат, 1978. С. 85-112.
10. Роговин В.В., Муштакова В.М., Фомина В.А. Действие некоторых ксенобиотиков на зависимый от пероксидазы иммунитет растений // Известия РАН. 1996. №5. С. 613.
11. Стом Д.И. Фитотоксичность и механизмы детоксикации фенолов водными растениями / Автореф. дисс. ... д-ра хим. наук. Киев, 1982. С. 3-6, 13-28, 37-38.
12. Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы во внешней среде. Минск: Наука и техника, 1994. 195 с.
13. Фиштейн Г.Н. Моделирование экосистем на основе одноклеточных организмов. М.: МГУ, 1983. С. 186-223.
14. Экологические исследования в управлении исследований и разработок агентства по охране окружающей среды США: обзор новых направлений // Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. 2001. №12. С. 21-28.