

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тверской государственный университет»
Кафедра физико-химической экспертизы биоорганических соединений

Г.П. Лапина

**Некоторые аспекты биоиндикации
экологического состояния окружающей
среды с использованием
ферментативной пероксидазной
системы различных биообъектов**

Монография

Тверь 2015

УДК 502.175:57
ББК Е081
Л 24

Рецензенты:

Доктор биологических наук, лауреат государственной премии

Г.Ю. Рабинович

Доктор химических наук, профессор

М.Г. Виноградова

Г.П. Лапина

Некоторые аспекты биоиндикации экологического состояния окружающей среды с использованием ферментативной пероксидазной системы различных биообъектов: монография — Тверь, ТвГУ, 2015. С. 115.

В монографии представлен экспериментальный материал автора об использовании ферментативных тестов и систем различных биообъектов (лишайников, березы бородавчатой (*Bétula verrucósa*), печеночницы обыкновенной (*Hepatica nobilis*) и сосны обыкновенной (*Pínus sylvéstris*)) для получения сведений и информации об экологическом состоянии окружающей среды. Особое внимание уделено особенностям их морфологии и строения, химического состава, чувствительности к загрязнению воздуха, источников поступления загрязняющих веществ.

Автором представлены экспериментальные доказательства эффективного использования ферментативных параметров пероксидазы в качестве индикаторов на придорожной полосе, для исследования экологического состояния лесопарковых зон, для получения важных и ценных сведений о развитии необратимых процессов деградации лесных экосистем и об эффективности использования ферментативных параметров пероксидазы в качестве надежного биоиндикатора, позволяющего оценить качественно и количественно степень загрязнения окружающей среды.

Учебное пособие предназначено и будет полезно для студентов-биологов, экологов, специалистов по охране окружающей среды, экологии питания, а также для всех, кто интересуется проблемами сохранения экологического равновесия природных биообъектов.

Автор выражает сердечную благодарность специалистам по УМР Мочаловой Е.В. и Громовой А.Д. за большую помощь в техническом оформлении монографии.

УДК

ISBN

© Г.П. Лапина, 2015

© Тверской государственный
университет, 2015

Содержание

Введение

I. О возможных чувствительных для определения загрязнений окружающей среды биообъектах

II. Лишайники

1. Особенности морфологии и строения, химический состав, чувствительность к загрязнению воздуха

2. Источники поступления загрязняющих веществ

3. Антиоксидантная система растений

4. Экспериментальные доказательства использования фермента пероксидазы лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) в качестве тестового объекта для оценки экологического состояния окружающей среды

4.1. Тестирование пероксидазы в образцах лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*)

4.1.1. Тестирование пероксидазы в водном экстракте лишайника, приготовленного различными способами

4.1.2. Определение концентрации пероксидазы в пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*)

4.1.3. Определения ферментативной активности пероксидазы в пармелии бороздчатой

4.1.3.1. Изучение ПО - кинетики при варьировании концентрации перекиси водорода (H_2O_2)

4.1.3.2. Изучение ПО-кинетики при варьировании расстояния от автодороги

4.1.3.3. Изучение изменений кинетики ферментативной реакции пероксидазы при варьировании концентрации субстрата (бензидина) на разных расстояниях от дороги

4.1.3.4. Выводы

4.1.3.5. Список литературы

III. Береза бородавчатая (*Bétula verrucósa*)

1. Распространение и экология, ботаническое описание

2. Экспериментальные доказательства использования фермента пероксидазы в качестве тестового объекта для оценки экологического состояния окружающей среды

2.1. Выделение пероксидазы из листьев берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*)

2.2. Определение количества белка по методу биуретовой реакции

2.3. Определение ферментативных параметров по методу Бояркина

2.4. Выделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

2.5. Выводы

2.6. Список литературы

IV. Печеночница благородная

1. Характеристика объекта

2. Печеночница благородная в Твери

3. Экологическое картирование

4. Экспериментальные доказательства использования фермента пероксидазы печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*) в качестве тестового объекта для оценки экологического состояния окружающей среды

4.1. Составление карт наличия исчезающего вида – печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*) в черте города Твери (Первомайская роща и роща в микрорайоне Мигалово)

4.2. Молекулярно-кинетические методы определения ферментативной активности пероксидазы печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*)

4.3. Выводы

4.5. Список литературы

V. Сосна обыкновенная

1. Биологические и экологические характеристики вида сосна обыкновенная (*Pínus sylvéstris*)

2. Действие загрязняющих веществ на растения

3. Характеристика приоритетных загрязнителей воздуха и их отрицательного воздействия на древесные растения

3.1. Диоксид серы

3.2. Оксид углерода

3.3. Оксиды азота

3.4. Аммиак

4. Пероксидаза - как компонент антиоксидантной системы живых организмов

4.1. Особенности строения молекулы пероксидазы

4.2. Механизмы действия пероксидазы

4.3. Роль пероксидазы в растительном организме

5. Экспериментальные доказательства использования фермента пероксидазы хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) в качестве тестового объекта для оценки экологического состояния окружающей среды

5.1. Выделение пероксидазы хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*)

5.2. Определение количества белка по методу биуретовой реакции в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*)

5.3. Определение ферментативных параметров по методу Бояркина

5.4. Выделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

5.5. Заключение

5.6. Список литературы

VI. Общее заключение

Приложение

Введение

Биоиндикацию можно проводить и проводят, как правило, на уровне молекул, клеток, органов (систем органов), организмов, популяций и даже биоценоза. Повышение уровня организации живой природы может приводить к усложнению, неоднозначности взаимосвязи биологического отклика с антропогенными факторами исследуемой среды, поскольку на них могут накладываться и природные факторы. Поэтому в качестве биотестов выбирают наиболее чувствительные к исследуемым загрязнителям организмы и системы.

Использование биохимических ферментативных реакций (молекулярный уровень индикации) связано с тем, что они наиболее чувствительны к воздействию внешних загрязнителей. В присутствии загрязнителей окружающей среды, например, происходит уменьшение содержания хлорофилла в мембранах хлоропластов растений или понижается способность фитопланктона к продуцированию кислорода в процессе фотосинтеза, меняется ферментативная активность энзимов. Это может служить индикаторным признаком воздействия на живую природу различных загрязнителей, газопылевых выбросов предприятий или токсичных компонентов сточных вод.

Все более возрастающее использование в аналитических процедурах не только биосенсоров, химических сенсоров, но и ферментативных тест-методов отмечается многими исследователями. Эта тенденция связана с необходимостью приблизить источник получения информации о составе среды непосредственно к месту события, по возможности сделать его индивидуальным и экономичным. Можно наблюдать и определенное сходство принципов работы тест-методов и биохимических сенсоров. Можно ожидать, что потребность в диагностике объектов экологии, медицине, пищевой промышленности приведет к возрастанию роли именно ферментативных тест-методов. В данной работе основное внимание уделено использованию ферментативных тест-систем и кинетических подходов для исследования экологического состояния окружающей среды на примере различных биосистем и биообъектов.

I. О возможных чувствительных к загрязнениям окружающей среды биообъектах

Экологические проблемы городов, главным образом наиболее крупных из них, связаны с чрезмерной концентрацией на сравнительно небольших территориях населения, транспорта и промышленных предприятий, с образованием вредных веществ, а, следовательно, антропогенных ландшафтов, очень далеких от состояния экологического

равновесия.

Растения разными способами осуществляют детоксикацию вредных веществ. Некоторые из вредных веществ связываются цитоплазмой растительных клеток и становятся не активными, другие подвергаются превращениям в растениях до нетоксических продуктов и участвуют в обмене веществ (Луканин, 2001). К такой способности как детоксикация способна пероксидаза, которая повышает устойчивость растений к стрессам и поддерживает жизнеспособность организма при проявлении его пониженной функциональной активности (Рогожин, 2004).

В данной работе в качестве возможных биообъектов, чувствительных к загрязнению окружающей среды, рассмотрены и исследованы 4 биосистемы: лишайники, Береза бородавчатая (*Bétula verrucósa*), Печеночница обыкновенная (*Hepatica nobilis*) и сосна обыкновенная (*Pínus sylvéstris*).

II. Лишайники

1. Лишайники: особенности морфологии и строения, химический состав, чувствительность к загрязнению воздуха

Лишайники - своеобразная группа низших растений, которые состоят из двух разных организмов — гриба (представители аскомицетов, базидиомицетов, фикомицетов) и водоросли (зеленые — цистоккок, хлорококк, хлорелла, встречается кладофора пальмелла; сине-зеленые — носток, глеокапса, хроококк), образующих симбиотическое сожительство, отличающееся особыми морфологическими типами и особыми физиолого-биохимическими процессами (Лиштва, 2007).

Считалось, что в состав некоторых лишайников входят бактерии (Азотобактер). Однако более поздние исследования не подтвердили наличия их в лишайниках.

Лишайники отличаются от других растений следующими особенностями (Зенова, 1999):

1. Симбиотическое сожительство двух разных организмов — гетеротрофного гриба (микобионт) и автотрофной водоросли (фикобионт). Лишайниковое сожительство постоянно и исторически обусловлено, а не случайно, кратковременно. В настоящем лишайнике гриб и водоросль вступают в тесный контакт, грибной компонент окружает водоросль и может даже проникать в ее клетки.

2. Специфичные морфологические формы внешнего и внутреннего строения.

3. Физиология гриба и водоросли в слоевище лишайника во многом отличается от физиологии свободноживущих грибов и водорослей.

4. Специфична биохимия лишайников: они образуют вторичные продукты обмена, не встречающиеся в других группах организмов.

5. Способ размножения.

6. Отношение к экологическим условиям.

Морфология. Лишайники не имеют типичной зеленой окраски, у них нет стебля, листьев (этим они отличаются от мхов), тело их состоит из слоевища. Окраска лишайников сероватая, зеленовато-серая, светло- или темно-бурая, реже желтая, оранжевая, белая, черная. Окраска обусловлена пигментами, которые находятся в оболочках гиф гриба, реже в протоплазме. Различают пять групп пигментов: зеленые, синие, фиолетовые, красные, коричневые. Цвет лишайников может зависеть также от окраски лишайниковых кислот, которые откладываются в виде кристаллов или зерен на поверхности гиф.

Различают лишайники накипные, или корковые, листовые и кустистые. У накипных таллом имеет вид порошкообразной, бугорчатой или гладкой кожицы, которая плотно срастается с субстратом; к ним принадлежит около 80 % всех лишайников. В зависимости от субстрата, на котором произрастают накипные лишайники, различают: эпилитные, развивающиеся на поверхности горных пород; эпифлеодные — на коре деревьев и кустарников; эпигейные — на поверхности почвы, эпиксильные — на гниющей древесине. Слоевище лишайника может развиваться внутри субстрата (камня, коры дерева). Есть накипные лишайники с шаровидной формой слоевища (так называемые кочующие лишайники) (Сайт «ecosystema.ru»).

У листовых лишайников таллом имеет вид чешуек или достаточно больших пластинок, которые прикрепляются к субстрату в нескольких местах с помощью пучков грибных гиф. Наиболее простое слоевище листовых лишайников имеет вид одной крупной округлой листовидной пластинки, достигающей в диаметре 10—20 см. Такое слоевище называется монофильным. Оно крепится к субстрату в своей центральной части с помощью толстой короткой ножки, называемой гомфом. Если слоевище состоит из нескольких листовидных пластинок, его называют полифильным. Характерной особенностью листового слоевища лишайников является то, что его верхняя поверхность отличается по строению и окраске от нижней. Среди листовых лишайников также встречаются неприкрепленные, кочующие формы.

У кустистых лишайников таллом состоит из разветвленных нитей или стволиков, срастается с субстратом лишь основанием; растут вверх, в сторону, или свисают вниз — «бородатые» лишайники. Слоевище кустистых лишайников имеет вид прямостоячего или повисающего

кустика, реже неразветвленных прямостоячих выростов. Это высший этап развития слоевища. Высота самых маленьких составляет всего несколько миллиметров, наиболее крупных — 30 — 50 см (иногда 7—8 м — уснея длинная, свисающая в виде бороды с ветвей лиственниц и кедров в таежных лесах). Слоевища бывают с плоскими и округлыми лопастями. Иногда у крупных кустистых лишайников в условиях тундр и высокогорий развиваются добавочные прикрепительные органы (гаптеры), с помощью которых они прирастают к листьям осок, злаков, кустарников. Таким образом, лишайники предохраняют себя от отрыва сильными ветрами и бурями (Зенова, 1999).

Внутреннее строение лишайников. По анатомическому строению различают лишайники двух типов. У одного из них водоросли разбросаны по всей толще слоевища и погружены в слизь, которую выделяет водоросль (гомеомерный тип). Это наиболее примитивный тип. Такое строение характерно для тех лишайников, фикобионтом которых являются синезеленые водоросли — носток, глеокапса и др. Они образуют группу слизистых лишайников. У другого (гетеромерный тип) на поперечном срезе можно под микроскопом различить несколько слоев. Сверху находится верхняя кора, имеющая вид переплетенных, тесно сомкнутых грибных гиф. Под ней гифы лежат более рыхло, между ними расположены водоросли — это гонидиальный слой. Ниже грибные гифы расположены еще более рыхло, большие промежутки между ними заполнены воздухом — это сердцевина. За сердцевиной следует нижняя кора, которая по строению подобна верхней. Через нижнюю кору из сердцевины проходят пучки гиф, которые прикрепляют лишайник к субстрату. У корковых лишайников нижней коры нет и грибные гифы сердцевины срастаются непосредственно с субстратом. У кустистых радиально построенных лишайников на периферии поперечного разреза находится кора, под ней — гонидиальный слой, а внутри — сердцевина. Кора выполняет защитную и укрепляющую функции. На нижнем коровом слое лишайников обычно образуются органы прикрепления. Иногда они имеют вид тонких нитей, состоящих из одного ряда клеток. Их называют ризоидами. Ризоиды могут соединяться, образуя ризоидальные тяжи, У некоторых листовых лишайников слоевище прикрепляется с помощью короткой ножки (гомфа), расположенной в центральной части слоевища.

Зона водорослей выполняет функцию фотосинтеза и накопления органических веществ. Основная функция сердцевины — проведение воздуха к клеткам водорослей, содержащим хлорофилл. У некоторых кустистых лишайников сердцевина выполняет и укрепляющую функцию (Федоров, 1977).

Органами газообмена служат псевдоцифеллы (разрывы коры, заметные невооруженным глазом как белые пятнышки неправильной формы). На нижней поверхности листовых лишайников есть круглые правильной формы белые углубления — это цифеллы, также органы газообмена. Газообмен осуществляется и через перфорации (отмершие участки корового слоя), трещины и разрывы в коровом слое.

Гифы играют роль корней: они впитывают воду и растворенные в ней минеральные соли. Клетки водорослей образуют органические вещества, выполняют функцию листьев. Воду лишайники могут впитывать всей поверхностью тела (используют дождевую воду, влагу туманов). Важным компонентом в питании лишайников является азот. Те лишайники, которые в качестве фикобионта имеют зеленые водоросли, получают соединения азота из водных растворов, когда их слоевище пропитывается водой, частично прямо из субстрата. Лишайники, имеющие в качестве фикобионта сине-зеленые водоросли (особенно ностоки), способны фиксировать атмосферный азот (Зенова, 1999).

Химический состав лишайников. В состав лишайников входят многие элементы и вещества. Все их можно разделить на две большие группы – первичные и вторичные. К первичным относятся те вещества, которые непосредственно принимают участие в клеточном обмене веществ; из них построено тело лишайников. К вторичным относятся конечные продукты обмена веществ, располагающиеся обычно на стенках гиф. Многие из этих вторичных лишайниковых веществ специфичны для лишайников и не встречаются в организмах из других систематических групп.

Первичные вещества в лишайниках в общем те же, что и в других растениях. Оболочки гиф в лишайниковом слоевище составлены в основном углеводами. Часто обнаруживается в гифах хитин ($C_{30}H_{30}N_4O_{10}$). Характерной составной частью гиф является полисахарид лишенин ($C_6H_{10}O_5$)_n, называемый лишайниковым крахмалом. Реже встречающийся изомер лишенина-изолишенин-гайден, кроме оболочек гиф, в протопласте. Из высокомолекулярных полисахаридов в лишайниках, в частности в оболочках гиф, встречаются гемицеллюлозы, являющиеся, очевидно, резервными углеводами.

В довольно большом количестве (3-5 % от воздушно-сухой массы) встречаются низкомолекулярные углеводы-дисахариды (сахароза, а-трегалоза, умбилицин), полиспирты (эритрин, D-маннит, волемит, сифулит). В межклеточных пространствах у некоторых лишайников обнаружены пектиновые вещества, которые, впитывая в большом количестве воду, набухают и ослизняют слоевище. В лишайниках встречаются также многие ферменты - инвертаза, амилаза, каталаза, уреазы, зимаза, лишеназа, в том числе и внеклеточные. Из

азотосодержащих веществ в гифах лишайников обнаружены многие аминокислоты - аланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин, валин, тирозин, триптофан и др. Фикобионт продуцирует в лишайниках витамины, но почти всегда в малых количествах. Обнаружены аскорбиновая кислота (витамин С), биотин (Н), кобаламин (B_{12}), никотиновая кислота и некоторые другие витамины.

Лишайники обладают удивительной способностью извлекать из окружающей среды и накапливать в своем слоевище различные элементы, в том числе и радиоактивные. В США после испытаний атомного оружия в умбиликарии был обнаружен радиоактивный цезий в количестве, губительном для высших растений. В лишайниках накапливается намного больше цинка, кадмия, олова и свинца, чем в мхах и цветковых растениях (Илькун, 1978).

Иногда наблюдается явный параллелизм между минеральным составом лишайников и содержанием веществ в субстрате. У некоторых лишайников, особенно растущих на камнях и скалах, накапливаются соли железа, придающие слоевищу ржаво-красный цвет. У многих видов в слоевище накапливается щавелевокислый кальций (CaC_2O_4), иногда и очень большом количестве. Например, у асицилии съедобной он составляет до 60% от сухой массы. Биологическое значение этого вещества в слоевище лишайников не известно.

Фотосинтезирующие пигменты хлорофилл а и хлорофилл b встречаются в фикобионте лишайника в меньшем количестве, чем у высших растений. В некоторых видах обнаружены каротины и ксантофиллы.

Вторичные лишайниковые вещества представляют большую группу органических соединений, относящихся к разным биосинтетическим группам. Количество вторичных лишайниковых веществ в слоевищах лишайников колеблется в довольно широких пределах, обычно их бывает 0,1-2%, от воздушно-сухой массы, реже до 2-5%. Так, например, атранорин содержится в пределах 1,2 - 3% , гирофоровая кислота -1-4%, саланциновая кислота 4-6%, успиновая кислота 0,2-4% и т. д. В некоторых исключительных случаях концентрация лишайниковых веществ в слоевище может быть очень высокой. Так, например, в пармелии окрашенной леканоровой кислоты содержится 36% от сухой массы.

Лишайниковые вещества образуются микобионтом лишайника в симбиозе с фикобионтом, т.е. углеводы, синтезированные фикобионтом превращаются в лишайниковые вещества микобионтом. Сам по себе гриб, выделенный из слоевища лишайника, почти никогда специфического лишайникового вещества не образует.

Существует мнение, что вторичные вещества защищают лишайники от поедания животными. В то же время известно, что многие кустистые лишайники, содержащие горькие вещества, хорошо поедаются животными: северные олени, карibu, улитки, пауки и др. Но лишайники весьма резистентны в отношении бактерий. Против них лишайниковые вещества выполняют, несомненно, защитную функцию.

Многие исследователи считают лишайниковые вещества резервом дополнительного питания, но экспериментальные данные этого не подтверждают - при ухудшении условий питания количество лишайниковых веществ в слоевище не уменьшается.

Иногда лишайниковые вещества рассматривают как отходы обмена веществ, что также является сомнительным. Для этого они слишком многообразны в химическом отношении и появляются в одинаковой химической форме у систематически и экологически очень далеких видов.

Большинство лишайников очень медленно растет, что резко снижает их способность конкурировать с другими организмами за пространство и другие условия существования. По-видимому, лишайниковые вещества являются одним из видов «оружия» в суровой борьбе за существование. Установлено, что лишайниковые вещества подавляют рост грибов и мхов и всхожесть семян цветковых растений.

Некоторые экспериментальные данные показывают, что лишайниковые вещества способствуют передвижению углеводов, синтезируемых фикобионтом, в гифы микобионта. В этом может заключаться одна из важных функций лишайниковых веществ.

Лишайники часто бывают «пионерами» заселения свободных субстратов (поверхность скал и камней, древесины и др.). Установлено, что лишайниковые играют определенную роль в этом процессе. Они разрушающе действуют на твердые минеральные субстраты и являются тем самым зачинателями почвообразовательного процесса.

Среди лишайников имеется группа видов, у которых в разных частях ареала различный состав лишайниковых веществ и некоторые лихенологи считают химические вариации морфологически единого вида самостоятельными видами, другие же называют их просто химическими расами одного и того же вида (Федоров, 1977).

Не найдены сведения о пероксидазе лишайников как детоксиканте от вредных в плане экологии компонентов окружающей среды. В тоже время все возможности (в плане химического строения, биохимических функций и т.д.) для этого у лишайника имеются.

Чувствительность лишайников к загрязнению воздуха (Трахтенберг, 1994; Ильин, 2001; Серегин, Иванов, 2002; Голдовская, 2005). Степень чувствительности лишайников к загрязнению воздуха

определяется на основе изучения многих признаков этих организмов. Выбор изучаемых признаков зависит от типа и уровня имеющегося загрязнения, выбранных видов лишайников, особенностей исследования и возможностей исследователя (Трасс, 1988).

Морфологические изменения

Заметные морфологические изменения слоевищ нельзя вызвать в лабораторных условиях, поскольку для этого недостаточно времени. Зафиксировать изменение морфологических показателей талломов можно только в природе и только при достаточно длительном воздействии загрязнителя. Обычная реакция – изменение цвета до полного обесцвечивания, часто выявляется приобретение розовой или коричневатой окраски, а также наличие популяции более компактных и мелких талломов. Некоторые морфологические изменения являются видоспецифичными. Так, в зависимости от действия окислителей, у представителей рода *Nurogymnia* заметно варьирует окраска. У видов *Cladonia* действие озона и кислотных осадков вызывает необычное увеличение высоты и характера ветвления таллома. Для лишайников рода *Peltigera*, произрастающих на почвах с высоким содержанием металлов характерно укорочение ризин и гипертрофия сердцевины. Талломы *Nurogymnia physodes* в городах имеют более толстый водорослевый слой и более тонкий слой коры (Лиштва, 2007).

Осмотр слоевища невооруженным взглядом или при помощи лупы позволяет оценить внешний вид избранных видов и выявить такие свойства лишайников, как цвет, размер, особенности размножения. Преимущество такого способа в том, что он не требует сложного оборудования и больших затрат.

Выводы делаются на основе сравнения фиксированных признаков: до и после обработки загрязнителем; □ через определенные промежутки времени на тех же местах; □ и (или) по градиенту расстояния от известного источника загрязнения.

Репродуктивная способность является очень чувствительным механизмом, снижение которой может привести к исчезновению представителей вида с территории. Изменение репродуктивного потенциала вследствие загрязнения обнаруживается раньше других визуальных повреждений слоевища. В более загрязненных 106 районах образование слоевищами апотециев заметно снижается.

Повышенная концентрация SO_2 в воздухе стимулирует образование соредий и изидий, но уровень выживаемости этих вегетативных диаспор снижается.

Лишайники растут намного медленнее сосудистых растений, поэтому рост как показатель их реакции на загрязнение воздуха используется в полевых работах нечасто. Месячный прирост, выражаемый как увеличение сухого веса или размера слоевищ, можно определить только для быстрорастущих видов. Фотографирование и точные способы измерения площади слоевищ демонстрируют снижение скорости роста в загрязненных районах (Лиштва, 2007).

При изучении реакции микобионта и фотобионта на загрязнение установлено, что грибной компонент более толерантен к загрязнению, чем водоросль.

Физиологические процессы. Изучение физиологических процессов в лишайниках позволяет выявить отклонения от нормального функционирования организма или некоторых его частей под влиянием загрязнения воздуха. Существует много способов определения изменений показателей физиологических процессов, но все они требуют определенного уровня оснащения приборами. Кроме того, физиологические процессы варьируют в зависимости от сезона или географического положения. Также известно, что разные части одного слоевища отличаются по таким показателям, как фотосинтетическая и нитрогеназная активность, концентрация пигментов и т.д. Все эти особенности необходимо учитывать при сборе материала и интерпретации результатов (Лиштва, 2007).

Пигменты. Чаще всего для оценки повреждения слоевищ лишайников загрязнением среди пигментов используется хлорофилл и продукты его распада. Концентрации загрязнителей и время их воздействия изменяют общее содержание хлорофилла, отношения хлорофиллов a:b или отношение хлорофилла к продуктам его распада, снижается также процент концентрации хлорофилла. Одним из видимых сигналов повреждения лишайников является обесцвечивание или изменение цвета слоевища, которое вызывается разрушением молекул хлорофилла. В лишайниках постоянно обнаруживаются общие хлорозы и некрозы как реакция на SO₂, HF, окислители и Cu, но специфический характер реакции на действие какого-либо конкретного загрязнителя еще не установлен (Лиштва, 2007).

Начальное разрушение хлорофиллов a и b и соответствующие им феофитины (продукты распада) не обнаруживаемые визуально, можно определить при помощи экстракции и спектрометрических измерений. Для обнаружения начальных проявлений деградации пигментов используется метод микроскопического определения флуоресценции (Косулина, 1993). При голубом и ультрафиолетовом

возбужденном свете фотобионт показывает первичную красную флуоресценцию. После воздействия на слоевище SO_2 эта флуоресценция переходит сначала к коричневой или оранжевой и, наконец, к белой. В сравнении с экстракцией пигментов этот способ имеет преимущества в скорости, а также в возможности работы с более мелкими образцами лишайников (Лиштва, 2007).

Нитрогеназная активность. Около 10 % всех видов лишайников содержат цианобактерии, многие из которых могут фиксировать атмосферный азот и превращать его в форму, пригодную для использования (Инсарова, 1989; Николайкин, 2003). Эта способность лишайников зависима от pH при оптимуме pH 7 для изолированной *Nostoc*. В лишайнике этот оптимум может быть снижен в более кислую сторону pH 5. Дальнейшее окисление из-за загрязнения SO_2 или NO_2 может сдерживать фиксацию N_2 . Экспериментальные исследования подтвердили, что pH 4 дождевой воды является пороговым для фиксации азота большинством видов (Лиштва, 2007).

Измерение размеров фиксации азота является трудной и дорогостоящей процедурой. Однако измерение нитрогеназной активности проще и дешевле. В присутствии нитрогеназных ферментов ацетилен превращается в этилен. Соответственно, уровень нитрогеназной активности отражает количество произведенного этилена. Уровни этилена и ацетилена можно измерить на газовом хроматографе (Лиштва, 2007).

Дыхание, фотосинтез. Процессы фотосинтеза и дыхания регулируются мембранами и потому зависят от их целостности. Энергия для каждого процесса образуется за счет градиента pH плазмы двух сторон мембраны. Загрязнители воздуха воздействуют на целостность мембраны и pH плазмы. Фотосинтез измеряется главным образом как поглощение CO_2 или фиксация C; дыхание – как высвобождение CO_2 . Эти процессы наблюдаются только при определенном водонасыщении таллома. Сухие слоевища практически латентны и способны без вреда выдержать действие крайних температур. Фотосинтез, естественно – свойство фотобионта, тогда как дыхание – преимущество грибного компонента, поскольку доля грибной массы в лишайнике гораздо выше (Мокроносов, 1992). В общем, фотосинтез более чувствителен к загрязнению в сравнении с дыханием, это означает, что водоросли более чувствительны, чем грибы. Существенно снижают показатели фотосинтеза такие вещества, как SO_2 , озон, плавиковая кислота, а также низкие концентрации меди, серебра и ртути. Установлено, что магний, кальций, никель и цинк практически не влияют на скорость усвоения C (Лиштва, 2007).

Не удалось в литературе за 1961-2007 годы найти сведения о пероксидазе и ее роли в лишайнике. В тоже время, есть сведения о роли пероксидазы в растениях как детоксиканта. В связи с этим в данной работе поставлена задача – изучить влияние выхлопных газов на активность пероксидазы в лишайнике пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*).

2. Источники поступления загрязняющих веществ

Атмосферные источники. Атмосферные выпадения доходят до лишайников либо в жидком состоянии: собственно осадки (дождь, снег) и потенциальные, или скрытые осадки (главным образом туман, роса), либо в сухом - в результате седиментации аэрозолей, пыли, давления и поглощения газов. Как источники питательных веществ и воды, очень важны для лишайников потенциальные (скрытые) осадки, в которых концентрации питательных веществ и загрязнителей могут быть существенно выше, чем в дождевой воде (Лиштва, 2007). Также минеральные вещества могут попадать в лишайники в виде пыли, содержащей все важнейшие элементы, в том числе P, N, K, Ca.

Могут они также использовать некоторые соединения азота и аммония, находящиеся в воздухе, например, углекислый аммоний, образующийся при разложении богатых мочевиной продуктов животного происхождения, а лишайники с цианобионтом могут фиксировать и атмосферный азот. Седиментация крупных загрязняющих аэрозолей (Романова, 2005; Калверт, 1988) и их внедрение в лишайниковые слоевища хорошо показаны при сравнении химических профилей, полученных поданным преломления рентгеновских лучей в атмосферных аэрозолях, собранных прямо из воздуха, и в частицах, уловленных лишайником. Количественные данные о поглощении газов слоевищами лишайников ограничены, но поглощение SO₂ арктическим лишайникам, по меньшей мере, на порядок выше, чем типичными сосудистыми растениями (Бязров, 2002).

Поглощение и накопление лишайниками элементов из атмосферы хорошо документировано. Показана тесная корреляция между количеством металлов в золе накипных лишайников и содержанием их в сухом остатке осадков. С учетом медленного роста и гидролабильности лишайников, полагают, что атмосферные источники играют доминирующую роль в определении состава микроэлементов таллома (Лиштва, 2007).

Субстратные источники. Многие лишайники встречаются на почве или камнях и потому тесно контактируют с литосферными источниками элементов питания. Содержание элементов в лишайниках иногда довольно точно отражает их геохимическое распределение в минералах районов поселения лишайников, но в большинстве случаев корреляция между содержанием элементов в лишайниках составом субстрата более сложная. Так, напочвенные лишайники рода *Cladonia* из района угольных

разработок в Огайо накапливали P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Al, Mo в количествах, намного превышающих их концентрации субстратах. Однако лишайники, видимо, каким-то образом могут регулировать поглощение некоторых элементов, избыточных в субстрате, поскольку представители рода *Cladina*, растущие на сфагновых болотах, бедных железом, и на почвах, богатых железом, имели одинаковый уровень железа в слоевищах. Для лишайников, растущих на известняках, отмечено пониженное поглощение Ca, избыточного в субстрате и доступного для них (Квеситадзе, 2005; Павлова, 2000).

Интересно, что для мхов и лишайников, развивающихся на бедных микроэлементами субстратах, характерен более высокий коэффициент биологической аккумуляции микроэлементов и естественных радиоактивных элементов, чем у тех, которые росли на богатых ими субстратах). Также отмечено, что в мертвой базальной части лишайников вида *Cladonia* содержание Fe, Pb, Cu и золы выше, чем в живых верхушках, причем наибольшие различия у железа - в 2,5 раза у *Cladonia ;tellaris*, таллом которой постепенно переходит в органические остатки субстрата, это повышенное содержание железа, видимо, связано с особенностями субстрата. Кроме того, железо может поступать вниз и из верхушек, поскольку экспериментально установлено относительно быстрое передвижение Fe-55 от верхушки к основанию, и это движение однонаправленное.

Лишайники могут участвовать в выветривании поверхности субстрата как механически, так и химически, и при этом возможно поглощение лишайниками некоторых растворимых элементов питания. Растворимость многих элементов зависит от величины pH, поэтому доступность минеральных элементов может быть различной на известняковых и кислых субстратах. Как следствие, очень различный состав лишайниковых сообществ на известняках и на кислых породах. Более того, в гипсе наряду с Ca в более высоких концентрациях представлен и сульфат, и известны несколько видов лишайников, приуроченных к гипсу, например, *Asarospora clauzadeana* (Бязров, 2002).

Для эпифитных лишайников дополнительным источником питания являются вещества, вымываемые водой из деревьев и кустарников, поскольку большинство элементов способно вымываться дождем из кроны. Элементы типа K довольно быстро вымываются из листвы и, соответственно, могут поступить в тела эпифитов (Бязров, 2002). Двухвалентные катионы (Mn, Zn) вымываются легче, чем трехвалентные (Fe). Таким образом, вода, стекающая вдоль стволов деревьев во время дождя, содержит более высокие концентрации минеральных и растворенных органических веществ (включая углеводы), чем дождевая вода, выпадающая из атмосферы. На некоторых деревьях, особенно

наклоненных, часто сток по стволу во время осадков происходит по одной стороне ствола, на которой образуются своеобразные более темные в сравнении со всей остальной корой полосы. Некоторые виды лишайников приурочены именно к этим высоко обогащенным элементами питания участкам ствола. Вполне возможно, что эпифитные лишайники удовлетворяют потребности в питательных веществах в основном за счет дождевой воды, стекающей по стволам деревьев, что было показано для эпифитов горных лесов в полевых и лабораторных опытах. Но получают ли эпифитные лишайники питательные вещества дополнительно непосредственно из богатого органикой субстрата?

Анализ содержания N, P, Ca, K. и некоторых других элементов в коре деревьев и слоевищах на этой коре не обнаружил между ними связи. Г. Тротет изучал возможность поступления фосфора из дерева в растущий на нем лишайник, для чего живые ветки дуба *Quercus suber* с растущими на них лишайниками *Ramalina calicaris*, *Parmelia melanothrix* были помещены нижним срезанным концом в раствор радиоактивного фосфата калия. Для сравнения в такой же раствор помещали мертвые ветки, также обросшие лишайниками. Через 4 дня по всей длине живых веток обнаруживалась сильная радиоактивность, в лишайниках же она не отмечена, в мертвых ветвях она обнаруживалась в 1-2 см от срезанного конца, вероятно, за счет капиллярного подъема. Этот опыт позволил сделать вывод, что эпифитные лишайники не поглощают фосфор из тканей дерева-носителя (Бязров, 2002).

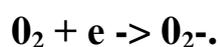
Однако наблюдаются большие различия между составами элементов питания коры деревьев разных пород. Их доступность, как и на горных породах, зависит от величины рН коры. Результатом этого является различный состав лишайниковых сообществ, встречающихся на деревьях с нейтральной корой (*Fraxinus*, *Tilia*) в сравнении с деревьями с кислой корой (*Betula*, *Picea*, *Pinus*). Источники загрязнения также могут изменять свойства коры, как добавлением элементов, так и изменением величины рН. Кислотные выпадения часто понижают величину рН коры, что приводит к изменению лишайниковых сообществ, встречавшихся ранее на нейтральном субстрате, а выпадения Са, ассоциируемые с цементными предприятиями, могут увеличить значение рН. Как следствие, происходит смена лишайникового сообщества, свойственного кислому субстрату, на сообщество, характерное для нейтрального субстрата (Бязров, 2002).

Таким образом, в работах (Трасс, 1988; Инсарова, 1989; Бязров, 2002;) есть косвенные указания на возможное участие лишайников в детоксикации вредных компонентов окружающей среды.

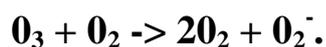
3. Антиоксидантная система растений

Большая часть живых организмов на Земле не может обходиться без кислорода, который играет ключевую роль в энергетике, являясь окислителем питательных веществ. Молекулярный кислород не токсичен для клеток, однако опасность представляют продукты его неполного окисления: перекисные соединения, супероксидные радикалы, синглетный кислород и др. В связи с биологической активностью эти соединения получили название активные формы кислорода (АФК) (Неверова, 2009; Рогожин, 2004; Якушкина, 2004).

Появление АФК вызвано тем, что молекулярный кислород (O_2) может перехватывать электроны у некоторых переносчиков цепи электронного транспорта. В результате одноэлектронного восстановления молекулы кислорода образуется супероксидный радикал или анион-радикал:



Образование АФК происходит и при взаимодействии озона с кислородом:



Супероксидный радикал — заряженная частица, окруженная молекулами воды. Поэтому O_2^- не может преодолеть мембрану, оказывается «запертым» в клетке и становится источником других форм АФК, например перекиси водорода:



Перекись водорода, в свою очередь, восстанавливается и дает гидроксил-радикал:



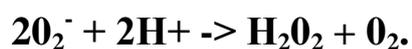
Реакционная способность последнего чрезвычайно высока, поэтому гидроксил-радикал способен окислить практически любое вещество клетки, включая ДНК. Концентрации АФК в тканях невысоки и составляют 10^{-8} — 10^{-11} М. АФК вызывают образование органических гидропероксидов (ROOH) ДНК, белков, липидов. Этот процесс называют перекисным окислением. Гидропероксиды в ходе метаболизма способны превращаться в различные окисленные соединения — спирты, альдегиды и др. Так, в ходе перекисного окисления липидов (ПОЛ) снижается содержание ненасыщенных жирных кислот, образуются различные производные жирных кислот, а

затем такие метаболиты как малоновый диальдегид, этан и др (Якушкина, 2004).

АФК образуются в различных частях клетки. У животной клетки наибольший вклад вносит дыхательная цепь митохондрий. У растений эти процессы происходят еще и в хлоропластах. Поэтому у растений возможность образования АФК выше, чем в животной клетке. Возникновение АФК в хлоропластах обусловлено работой Rubisco по оксигеназному типу, а также фотосистемами. В ФС I появление супероксидного радикала связано с ферредоксином, а в ФС II — с фотолизом воды. В растительных митохондриях образование супероксидного радикала обусловлено не только функционированием ЭТЦ, но и наличием цианидоустойчивого дыхания.

Образование АФК в клетке происходит постоянно и является обычным метаболическим процессом. АФК принимают участие в защитных реакциях, например, при действии патогенов, а также служат вторичными посредниками в передаче сигналов. Однако при неблагоприятных воздействиях (засуха, затопление, повышенная температура, тяжелые металлы, механические повреждения, гербициды и др.) происходит чрезмерное накопление АФК, что может приводить к серьезным функциональным нарушениям, поскольку повреждаются различные компоненты клеток. Примером является иницирование пероксидного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран, что способствует нарушению их структуры и повышению проницаемости. АФК могут вызывать повреждение фотосинтетического аппарата хлоропластов (фотоингибирование). АФК вызывают модификацию нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Ингибируется деление клетки. Особенно АФК влияют на электронтранспортную цепь хлоропластов и митохондрий.

Защита клетки обеспечивается благодаря работе антиоксидантной системы (АОС), которая может осуществляться энзиматическим и неэнзиматическим путем. Основным способом защиты от АФК является их инактивация. Это достигается работой специальных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы. Супероксиддисмутаза (СОД) — фермент, который широко распространен в природе. В активном центре СОД содержатся ионы металлов (меди, железа, марганца, цинка). Так, в митохондриях содержится Mn СОД, в хлоропластах — Fe СОД, в цитоплазме и пероксисомах — Cu-Zn СОД. СОД присутствует во всех аэробных организмах и служит для эффективного удаления супероксидных радикалов. СОД катализирует реакцию превращения двух анион-радикалов в перекись водорода (H_2O_2) и молекулярный кислород:



Каталаза расщепляет перекись водорода с образованием воды и молекулярного кислорода, а пероксидазы восстанавливают перекись до воды специальными субстратами, например, глутатионон. Глутатиону принадлежит особая роль, что связано со способностью восстанавливать перекись водорода, гидропероксиды ROOH, а также обезвреживать вторичные метаболиты. Глутатион-зависимые ферменты работают во всех частях клетки, включая ядро, митохондрии и эндоплазматическую сеть. Антиоксидантный эффект селена также в основном опосредован глутатион-зависимыми ферментами. В растительной клетке перекись водорода образуется еще и при окислении гликолата, который является продуктом оксигеназной реакции, катализируемой РБФ-карбоксилазой/оксигеназой.

В состав АОС входят низкомолекулярные вещества-антиоксиданты, способные реагировать с АФК без участия ферментов. К таким веществам относятся каротины, витамины (А, Е, С) и др. Так, аскорбиновая кислота (витамин С) способна реагировать с супероксидным и гидроксильным радикалами и тем самым снижать их концентрацию в клетке. Важность работы каротиноидов по обезвреживанию АФК доказывается опытами с мутантами. Мутанты микроорганизмов, лишенные каротиноидов, оказываются нежизнеспособными и погибают на свету в результате фотоокисления.

Другим механизмом защиты от АФК является уменьшение внутриклеточной концентрации молекулярного кислорода, а соответственно и АФК в клетке. Это достигается путем усиления фотодыхания, активированием альтернативной оксидазы в ЭТЦ митохондрий, энергетического использования поглощенного кислорода, например дыхательной цепью. Кроме того, в ответ на накопление АФК могут открываться поры на внутренней мембране митохондрий, что, по-видимому, связано с утечкой протонов. В результате стимулируется дыхание и «утилизируется» O_2 . При избыточном накоплении АФК клеткой и невозможности избавиться от них, клетки уничтожаются апоптозом.

Степень повреждений от АФК зависит от эффективности работы АОС и определяется устойчивостью растений. У устойчивых растений выше активность антиоксидантных ферментов, содержание витаминов Е и С. Показано, что введение в ткани СОД подавляет образование избыточных АФК и снижает гибель клеток под действием патогенов. Трансгенные растения с повышенной активностью СОД оказывались более устойчивыми в ряду стресс-факторов, в т. ч. водному дефициту (Якушкина, 2004).



Рис. 1. Лишайник пармелия бороздчатая (*Parmelia sulcata*)

4.1.1. Тестирование пероксидазы в водном экстракте лишайника, приготовленном различными способами

I способ. Тестирование пероксидазы с использованием фильтрации экстракта

Приготовление экстракта лишайника: воздушно-сухой лишайник (1 г) промывали дистиллированной водой, очищали от коры, стерилизовали 1 % -ой перекисью водорода. Снова смывали дистиллированной водой. Растирали в ступке с 7 мл дистиллированной водой и оставляли на ночь в темном шкафу (Моисеева, 1961). На следующий день эту растертую массу отфильтровали через фильтровальную бумагу с диаметром 90 мм в пробирку и получили водный экстракт лишайника.

Бензидиновая проба: к 1мл водного экстракта лишайника добавляли 5 капель спиртового раствора бензидина и затем 2 капли 0,5 %-ого раствора пероксида водорода. Было видно, что реакция не прошла, т.к. не было синего окрашивания.

Вывод: эта проба не выявила достаточного наличия пероксидазы в лишайнике пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*).

II способ. Тестирование пероксидазы с использованием центрифугирования экстракта

Приготовление экстракта лишайника: воздушно-сухой лишайник (1 г) промывали дистиллированной водой, очищали от коры, стерилизовали 1 %-ой перекисью водорода. Снова промывали дистиллированной водой. Растирали в ступке с 7 мл дистиллированной водой и оставляли на ночь в темном шкафу. На следующий день настоянный экстракт лишайника центрифугировали 15 мин при 3 тыс. оборотах в мин.

Бензидиновая проба: к 1мл водного экстракта лишайника добавляли 5 капель спиртового раствора бензидина и затем 2 капли 0,5 %-ого раствора пероксида водорода. Было видно, что реакция не прошла, т.к. не было синего окрашивания.

Вывод: этот метод приготовления экстракта лишайника также не выявил присутствие пероксидазы в лишайнике бороздчатом (*Parmelia sulcata*), т.к. не произошло окисления субстрата.

III способ. Тестирование пероксидазы в буферном растворе экстракта

Тестирование пероксидазы с использованием центрифугирования экстракта

Приготовление экстракта лишайника: воздушно сухой лишайник (0,8 г) промывали дистиллированной водой, стерилизовали 1%-ой перекисью водорода, промывали дистиллированной водой, растирали в ступке с 7 мл ацетатного буфера (рН 5,7). Далее через 30 мин помещали в пробирку и центрифугировали 15 мин при 3 тыс. оборотах в мин.

Бензидиновая проба: к 1 мл экстракта лишайника добавляли 5 капель спиртового раствора бензидина и затем 2 капли перекиси водорода 0,5%-ой. Было видно, что реакция не прошла, т.к. не наблюдали синего окрашивания.

Вывод: этот метод подготовки экстракта также не выявил присутствия пероксидазы в лишайнике бороздчатом (*Parmelia sulcata*), т.к. не было окисления субстрата.

Для тестирования пероксидазы в опытах 3.1.2.2. и в 3.1.2.3 , были взяты свежие сырые образцы лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) в районе Первомайской роши на расстоянии 1000 метров от Старицкого шоссе.

IV способ. Тестирование пероксидазы без центрифугирования экстракта

Приготовление лишайника растертого в ацетатном буфере: сырой образец лишайника (1 г) промывали водой, очищали от коры, стерилизовали перекисью водорода 1%-ой, промывали дистиллированной водой, растирали в ступке с 7 мл ацетатного буфера (рН 5,7) в течение 30 мин.

Бензидиновая проба: в фарфоровую чашу добавляли из ступки 2 капли экстракта лишайника, растертого с ацетатным буфером (рН 5,7), 5 капель спиртового раствора бензидина, 2 капли перекиси водорода 0,5%-ого – наблюдали образование зеленого окрашивания. Подогрели содержимое фарфоровой чаши на спиртовке – наблюдали изменение зеленого окрашивания в темно-коричневое, что свидетельствует о присутствии пероксидазы в лишайнике пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) и полноте экстракции фермента по данной методике.

Вывод: этот метод выявил присутствие пероксидазы в лишайнике.

V способ. Тестирование пероксидазы с помощью активированного угля и центрифугирования экстракта

Приготовление экстракта лишайника: сырой лишайник (1 г) промывали водой, очищали от коры, стерилизовали перекисью водорода 1%-ой, промывали дистиллированной водой; растирали в ступке с 7 мл ацетатного буфера (рН 5,7) в течение 30 мин. Перелили содержимое в колбу и добавили 4 мл ацетатного буфера и 2 таблетки активированного угля, колбу закрыли и оставили на ночь в холодильнике. На следующий день перелили все из колбы в пробирки и центрифугировала 15 мин при 3 тыс. оборотах в мин.

Бензидиновая проба: в пробирку к 1 мл экстракта лишайника добавили 1 мл спиртового раствора бензидина, 1 мл раствора перекиси водорода 0,5%-ого, 1 мл ацетатного буфера (рН 5,7) – наблюдали изменение окраски от сине-зеленого цвета в зеленый.

Вывод: этот метод выявил наличие пероксидазы в лишайнике, т.к. произошло окисление субстрата.

Общее заключение по I - V способам-методикам выделения пероксидазы из лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*): В работе на основе разных модификаций (I – V) методик выделения пероксидазы из лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) создали собственную методику, которая позволила

экспериментально доказать наличие этого фермента в изученном объекте - лишайник пармелия бороздчатая (*Parmelia sulcata*).

При экстрагировании пероксидазы из высушенных образцов лишайника с использованием фильтрации и центрифугирования бензидиновая проба не дала положительной реакции. В связи с этим использовали в качестве экстрагирующего раствора ацетатный буфер (pH 5,7) и добавляли центрифугирование. Бензидиновая проба в таком варианте также отрицательна. Поэтому далее брали невысушенные образцы лишайника, которые измельчали, экстрагировали пероксидазу ацетатным буфером (pH 5,7) с последующим центрифугированием. Бензидиновая проба в этом случае дала положительную реакцию. Именно этот вариант методики экстракции фермента с использованием активированного угля был использован для дальнейшего выполнения экспериментальной программы.

4.1.2 Определение концентрации пероксидазы в пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*)

Алгоритм выполнения этой части экспериментальной программы:

1. Вытяжки растительного материала делили на 5 проб по 0,5 мл и в каждую приливали 4 мл буретового реактива. Через 30 мин пробы фотометрировали в кюветах толщиной 1 см при комнатной температуре. В качестве контроля брали 0,5 мл H₂O.

Растворы в кюветах для опыта окрашены в серый цвет.

Растворы в кюветах для контроля окрашены в голубой цвет.

Изменение окраски исследуемых растворов – свидетельство наличия фермента пероксидазы.

Таблица 4.1.2.1 Зависимость оптической плотности от расстояния до автодороги

Удаленность от дороги, м	Оптическая плотность
100	0,191
300	0,183
500	0,166
1000	0,236

2. Сопоставляли полученные данные с калибровочной кривой (рис. 4.1.2.1.) для расчета концентрации пероксидазы (табл. 4.1.2.1):

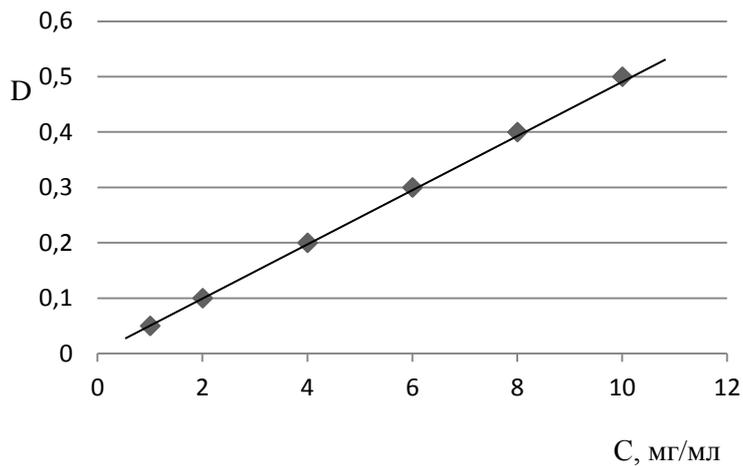


Рис. 4.1.2.1. Калибровочный график зависимости оптической плотности водных растворов САЧ от их концентрации белка

Таблица 4.1.2.2 Зависимость удаленности от дороги биообъекта от концентрации пероксидазы в лишайнике

Отдаленность от дороги, м	Концентрация белка- фермента пероксидазы, мг/мл
100	3,82
200	2,6
300	3,66
500	3,32
1 000	4,72

3. По данным таблицы 4.1.2.2 построили график (Рис. 4.1.2.2).

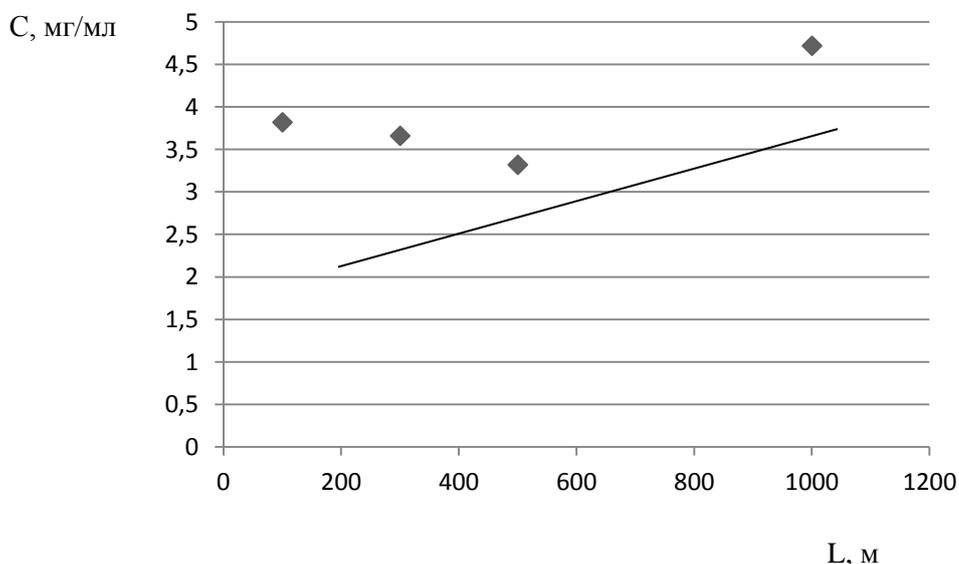
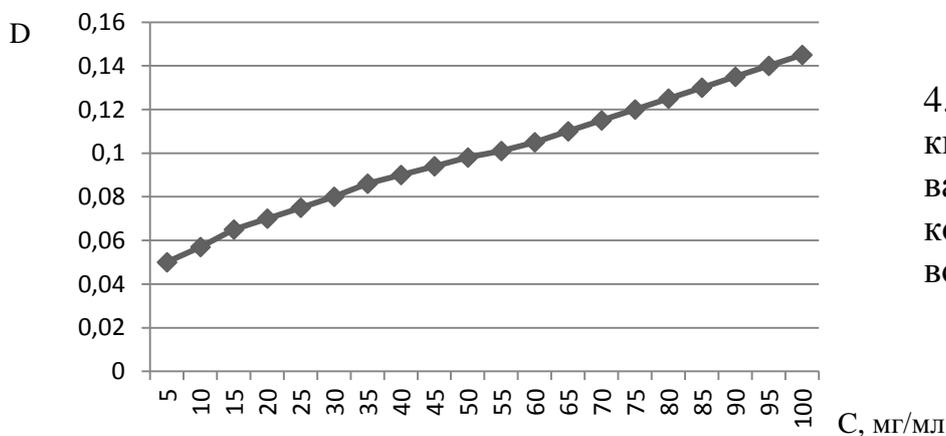


Рис. 4.1.2.2 Зависимость расстояния сбора образцов биообъекта от концентрации пероксидазы

Видна тенденция: чем дальше от автодороги (L, м), тем выше концентрация пероксидазы в лишайнике пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*). Это может быть связано с тем, что компоненты выхлопных газов угнетающе действуют на активность пероксидазы, ингибируя ее. Это объяснение может быть рассмотрено как указание на то, что фермент пероксидаза лишайника может выполнять функции тест-фермента по оценке экологического состояния воздушной среды. Однако это обстоятельство требует более детального исследования параметров ферментативной кинетики пероксидазы лишайника, что и предпринято в дальнейшей работе.

4.1.3 Определения ферментативной активности пероксидазы в пармелии бороздчатой



4.1.3.1 Изучение ПО кинетики при варьировании концентрации перекиси водорода (H_2O_2)

Для этого исследования были изучены образцы лишайника, которые были собраны на расстоянии 1000 метров от Старицкого шоссе.

Брали для исследования перекись водорода (H_2O_2) с концентрациями (%): 0,2; 0,4; 0,5; 0,7

1. Для каждого эксперимента было взято две кюветы: одна для опыта, вторая для контроля.

В кювету для контроля добавляли: 0,25 мл экстракта лишайника, 0,25 мл ацетатного буфера, 1 мл бензидина, 0,5 мл воды (H_2O).

В кювету для опыта добавляли: 0,25 мл экстракта лишайника, 0,25 мл ацетатного буфера, 1 мл бензидина, 0,5 мл перекиси водорода (H_2O_2).

2. Две кюветы ставили в спектрофотометр и снимали показатели оптической плотности через каждые 5 с. Получили 4 графика при разных концентрациях перекиси водорода (H_2O_2):

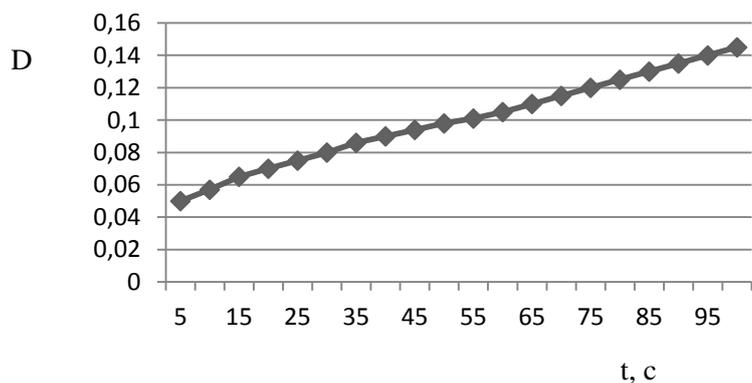


Рис. 4.1.3.1.1. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации перекиси водорода 0,2%

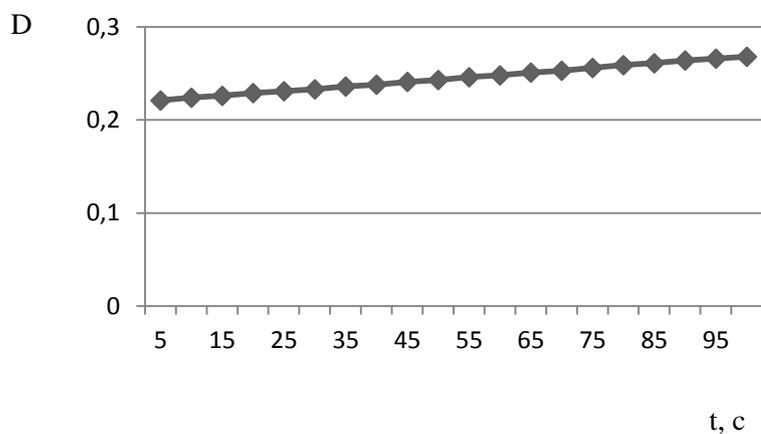


Рис. 4.1.3.1.2. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации перекиси водорода 0,4%

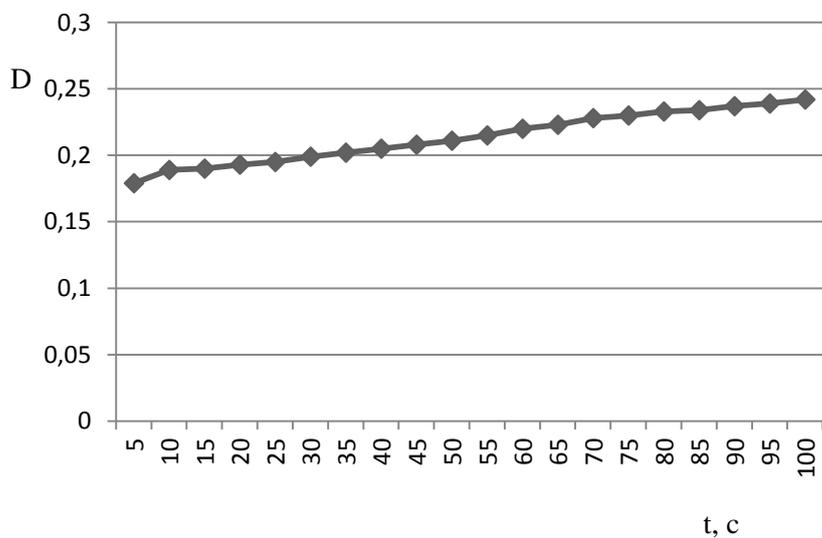


Рис. 4.1.3.1.3. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации перекиси водорода 0,5%

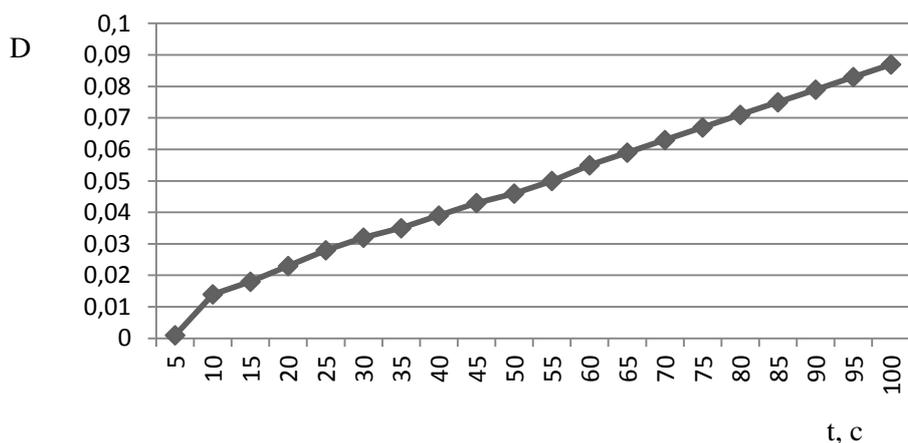


Рис. 4.1.3.1.4. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации перекиси водорода 0,7%

3. Далее рассчитывали обратные величины ($1/D$, $1/t$) для построения графика в координатах Лайнуивера-Берка ($1/V_0$; $1/[S]_0$) (рис. 4.1.3.1.5.).

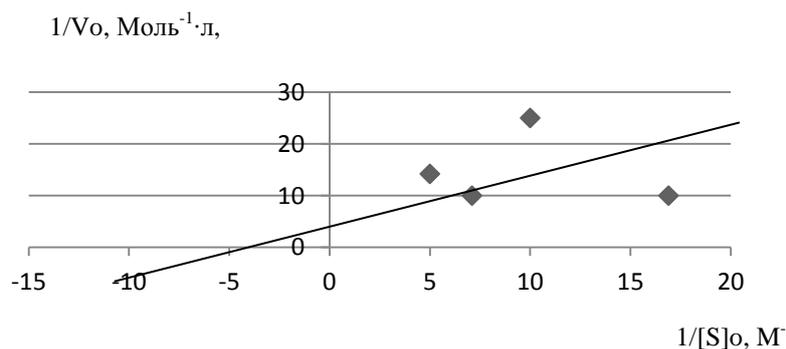


Рис. 4.1.3.1.5. Представление собственных экспериментальных данных в зависимости D-t в координатах Лануивера-Берка ($1/V_0$; $1/[S]_0$)

4. По графику (рис. 4.1.3.1.5.) находили ферментативные параметры и заносили в табл. 4.1.3.1.1.

Таблица 4.1.3.1.1. Расчетная таблица ферментативных параметров ПО лишайника при варьировании концентрации перекиси водорода

$V_0 \cdot 10^3, c$	$1/V_0, c^{-1}$	$[S]_0, M$	$1/[S]_0, M^{-1}$	k_M, M	$k_{кат}, c^{-1}$	V_{max}, c^{-1}	$1/V_{max}, c^{-1}$	$1/k_M, M^{-1}$
1	1000	0,59	16,9	0,1	0,0005	0,0013	7,3	9,6
0,4	2500	0,1	10					
1	1000	0,14	7,1					
0,7	1428	0,2	5					

Сравнение с результатами работы (Лихуша П.С., 2008; Лапина Г.П., 1998-2015) показало, что значение k_m пероксидазы лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) в 10 раз больше в сравнении с биотканями льна. Другой ферментативной параметр- V_{max} - в 10 раз меньше, $k_{кат}$ в 10^6 раз меньше значений этого параметра биотканей льна.

Таблица 4.1.3.1.2. Ферментативные параметры о-ДФО при варьировании концентрации перекиси водорода

$k_m \cdot 10^2,$ М	$k_{кат},$ с ⁻¹	$V_{max} \cdot 10^{-2},$ с ⁻¹
3,45±0,24	210	4,35±0,3

Вывод: при варьировании перекиси водорода скорость ферментативной реакции пероксидазы изменяется.

4.1.3.2 Изучение ПО-кинетики при варьировании расстояния от автодороги

Схема проведения работы была следующей:

1. Были взяты 4 образца лишайника пармелии бороздчатой с разной удаленностью от Старицкого шоссе (м) -100, 300,500,1000. Готовили экстракты фермента по созданной методике. Определяли комплекс ферментативных характеристик. Для этого:

В кювету для контроля было добавлено: 0,5 мл экстракта лишайника, 1 мл бензидина, 0,5 мл ацетатного буфера, 0,5 мл воды.

В кювету для опыта было добавлено: 0,5 мл экстракта лишайника, 1 мл бензидина, 0,5 мл ацетатного буфера, 0,5 мл перекиси водорода 0,5%-ной.

Две кюветы ставили в спектрофотометр и снимали с него показатели через каждые 5 с.

2. По этим показателям строили графики для 4-х систем:

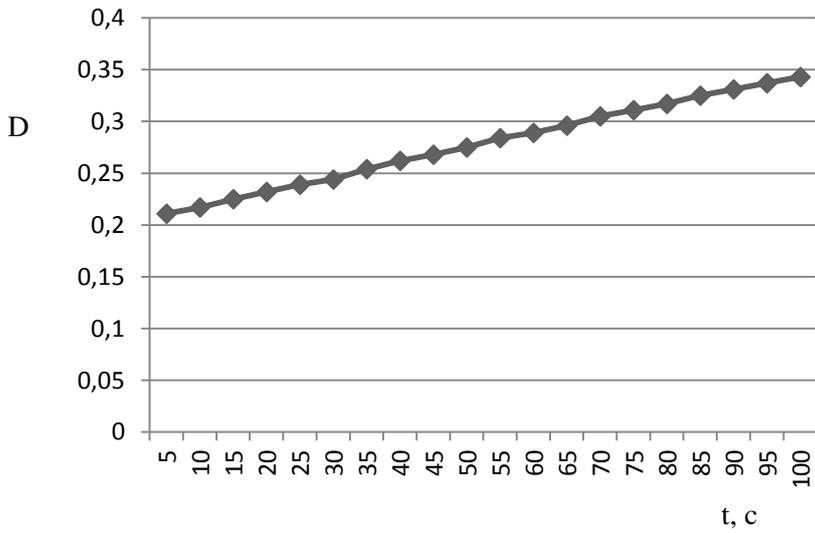


Рис.4.1.3.2.1. Кинетика ферментативной реакции ПО на расстоянии 100 метров от Старицкого шоссе

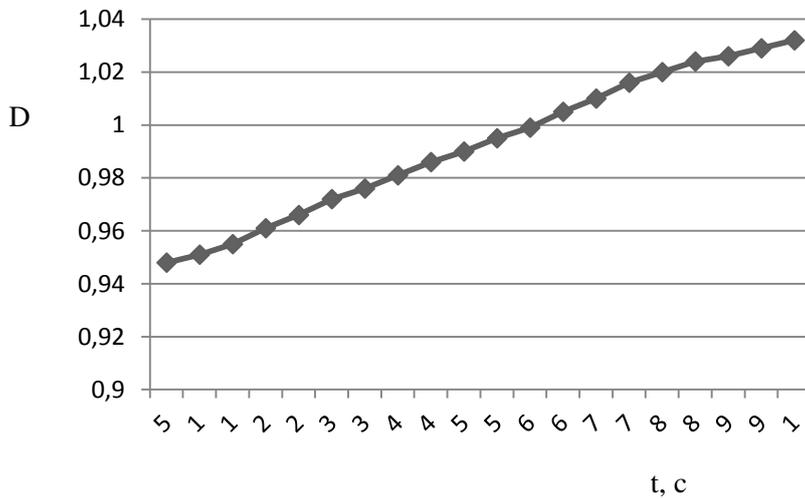


Рис.4.1.3.2.2. Кинетика ферментативной реакции ПО на расстоянии 300 метров от Старицкого шоссе

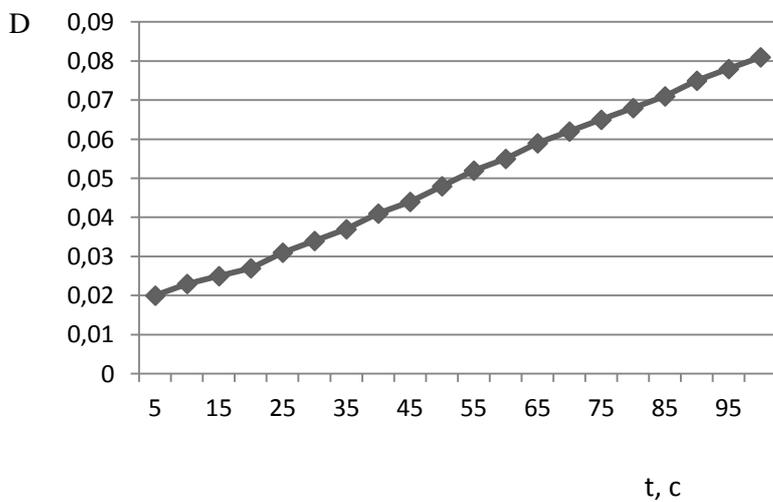


Рис.4.1.3.2.3. Кинетика ферментативной реакции ПО на расстоянии 500 метров от Старицкого шоссе

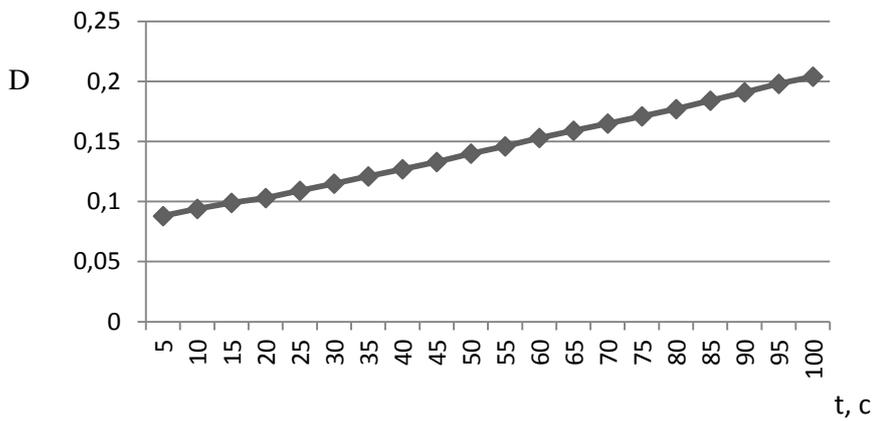


Рис.4.1.3.2.4. Кинетика ферментативной реакции ПО на расстоянии 1000 метров от Старицкого шоссе

4. По построенным графикам (рис. 4.1.3.2.1.- рис. 4.1.3.2.4.) находили показатель V_0 .

Таблица 4.1.3.2.1. Зависимость ферментативного параметра V_0 от расстояния

$V_0 \cdot 10^3, c$	L, м
1	100
0,7	300
1,2	500
1,7	1000

5. Строили график:

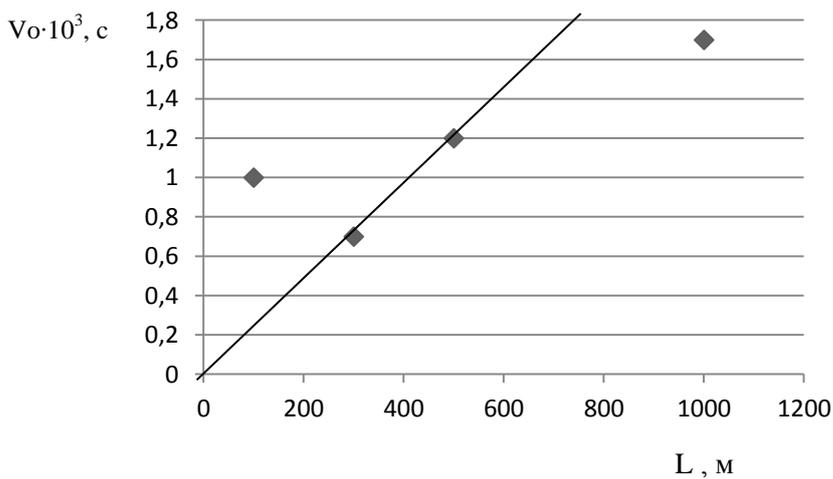


Рис. 4.1.3.2.5. Зависимость ферментативного параметра V_0 от расстояния

Вывод: видно, что чем дальше от автодороги, тем больше скорость ферментативной реакции. Это указывает на то, что компоненты выхлопных газов автотранспорта угнетают активность пероксидазы. То есть наиболее уязвимые для компонентов выхлопных газов являются образцы лишайника, собранные вблизи (на расстояниях до 300 м) от автомагистрали. Пероксидаза в них ингибирована практически наполовину (на 50%). На расстояниях, достигающих 1000 м, пероксидаза сохраняет свои нативные характеристики.

4.1.3.3 Изучение изменений кинетики ферментативной реакции пероксидазы при варьировании концентрации субстрата (бензидина) на разных расстояниях от дороги

Для экспериментов был взят бензидин с 3-мя разными концентрациями (10^{-5} М): 3,5; 1,75; 0,7.

1. Для опытов были взяты 4 образца лишайника пармелии бороздчатая с разной удаленностью от Старицкого шоссе (м) -100, 300,500,1000.

В кювету для контроля было добавлено: 0,5 мл экстракта лишайника, 1 мл бензидина, 0,5 мл ацетатного буфера, 0,5 мл воды.

В кювету для опыта было добавлено: 0,5 мл экстракта лишайника, 1 мл бензидина, 0,5 мл ацетатного буфера, 0,5 мл перекиси водорода 0,5%-ной.

2. Две кюветы ставили в спектрофотометр и снимали с него показатели оптической плотности через каждые 5 секунд.

3. По этим показателям строили графики для 4-х систем:

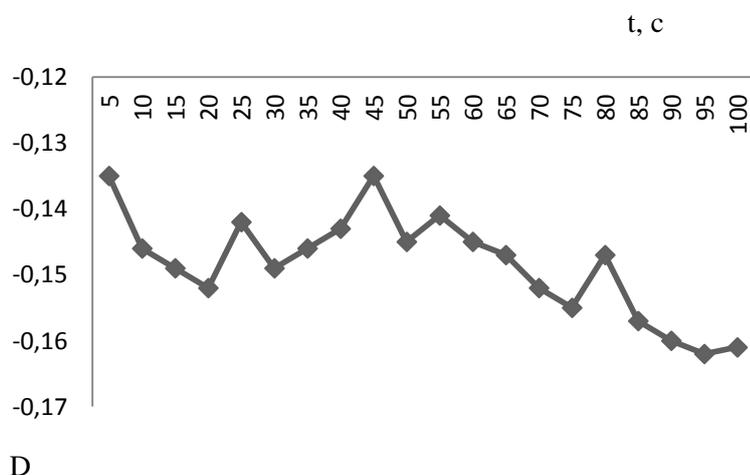


Рис. 4.1.3.3.1. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $3,5 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 100 м

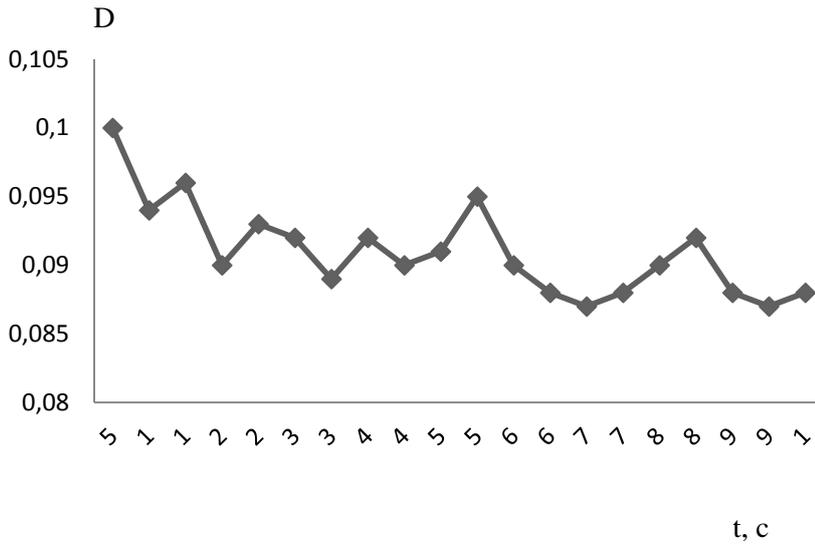


Рис. 4.1.3.3.2. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $1,75 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 100 м

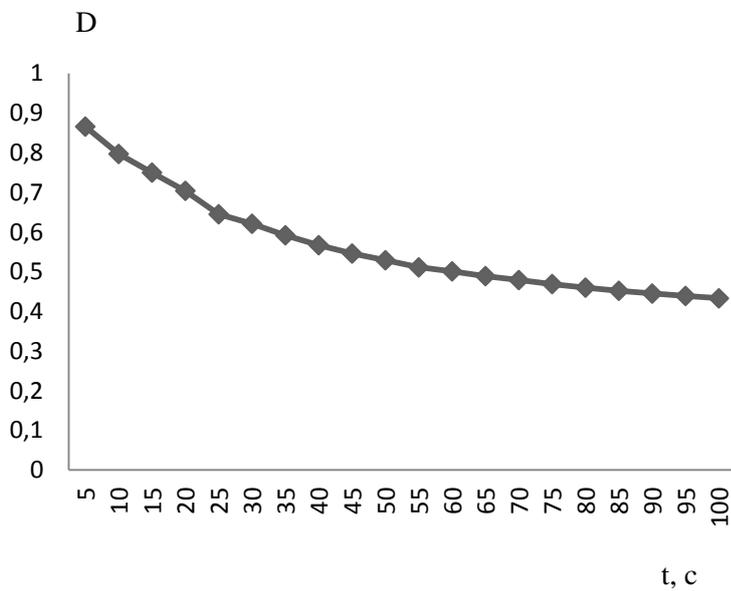


Рис. 4.1.3.3.3. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $0,7 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 100 м

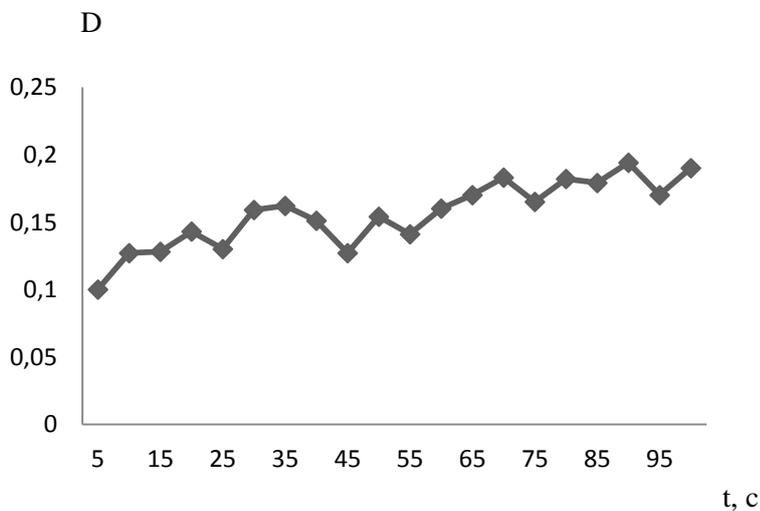


Рис. 4.1.3.3.4. Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $3,5 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 300 м

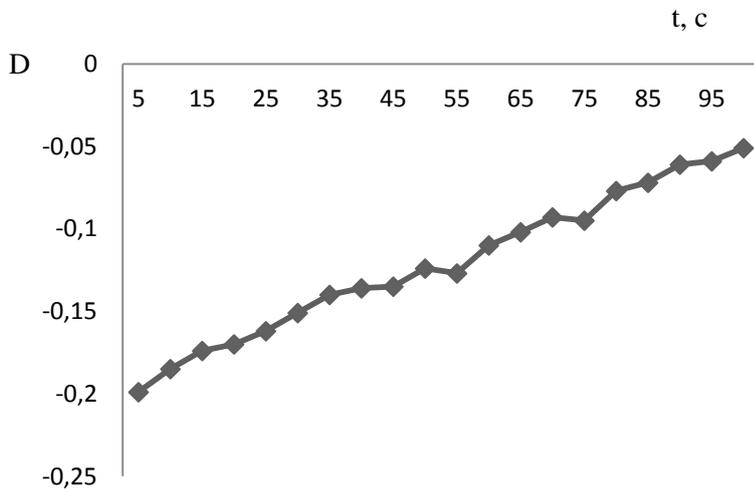


Рис. 4.1.3.3.5.
Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $1,75 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 300 м

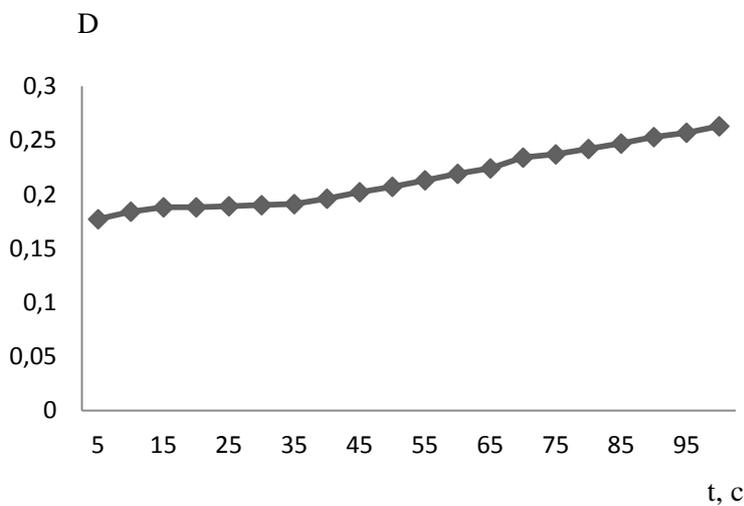


Рис. 4.1.3.3.6.
Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $0,7 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 300 м

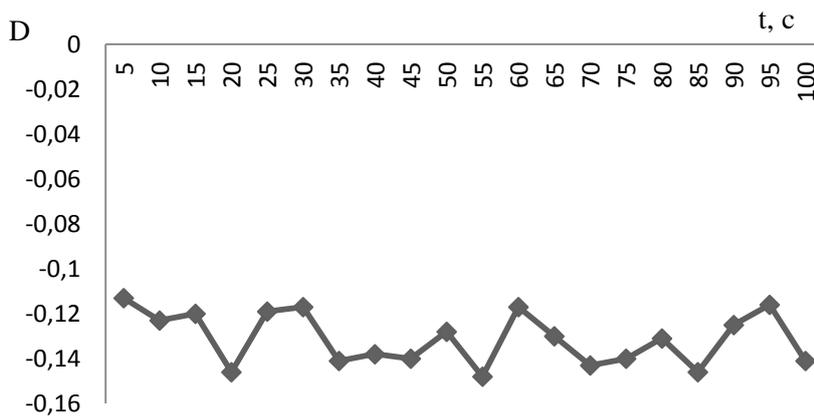


Рис. 4.1.3.3.7.
Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $3,5 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 500 м

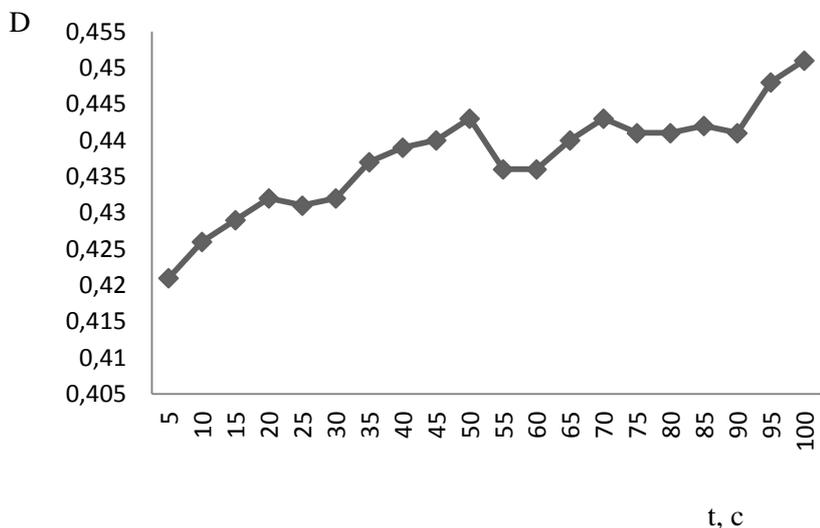


Рис. 4.1.3.3.8.
Зависимость
оптической плотности
от времени при
концентрации
бензидина $1,75 \cdot 10^{-5}$ М
удаленностью
от
дороги в 500 м

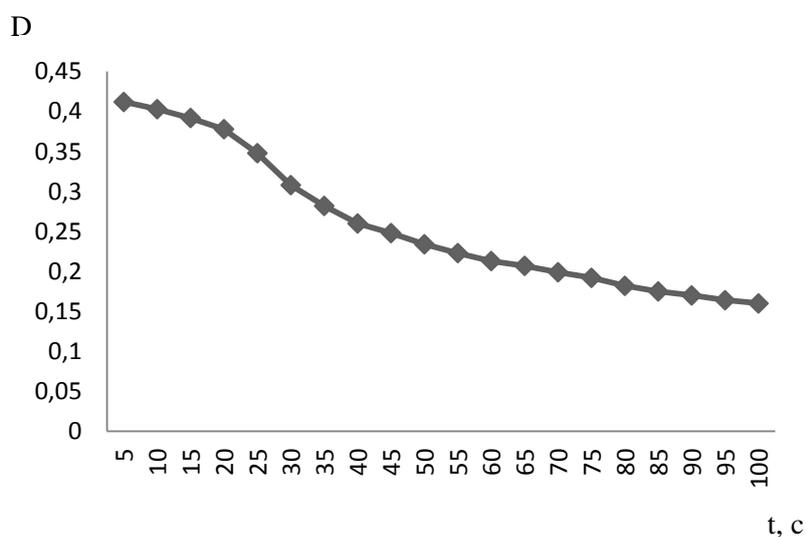


Рис. 4.1.3.3.9.
Зависимость
оптической плотности
от времени при
концентрации
бензидина $0,7 \cdot 10^{-5}$ М
удаленностью от
дороги в 500 м

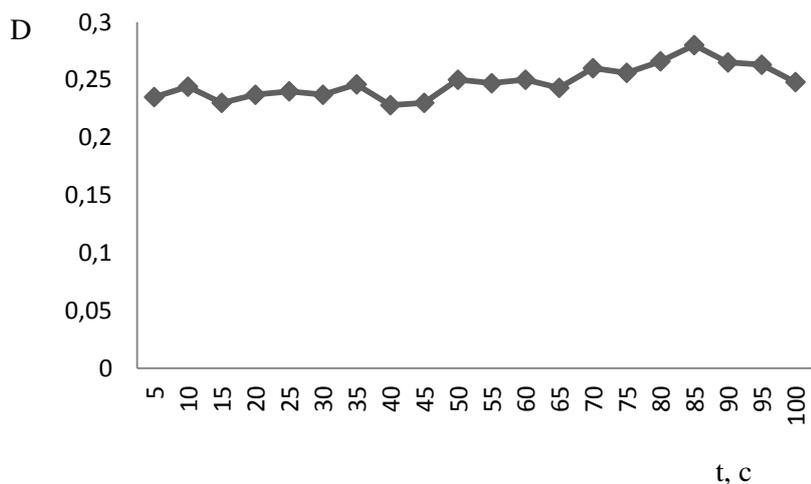


Рис. 4.1.3.3.10.
Зависимость
оптической плотности
от времени при
концентрации
бензидина $3,5 \cdot 10^{-5}$ М
удаленностью от
дороги в 1000 м

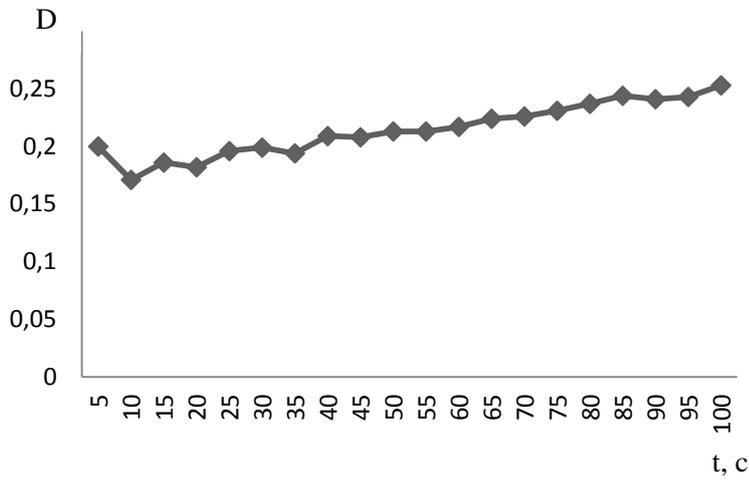


Рис. 4.1.3.3.11.
Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $1,75 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 1000 м

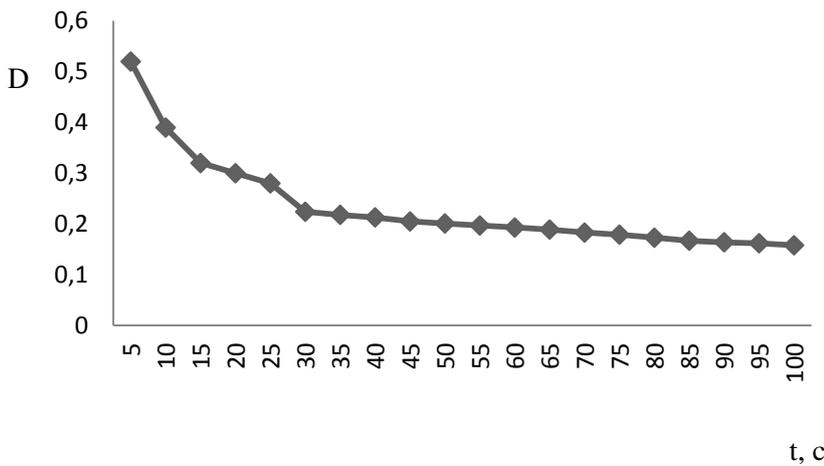


Рис. 4.1.3.3.12.
Зависимость оптической плотности от времени при концентрации бензидина $0,7 \cdot 10^{-5}$ М удаленностью от дороги в 1000 м

4. Находили все величины для построения графиков в координатах Лайнуивера-Берка ($1/V_0$; $1/[S]_0$), и строили эти графики для 100, 300, 500 и 1000 м удаленности от автодороги:

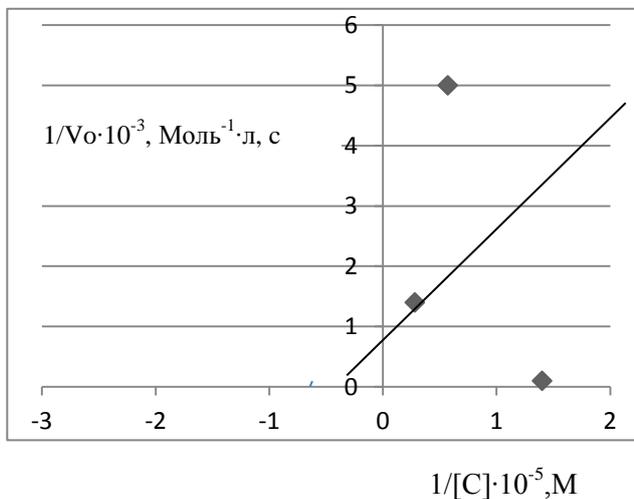


Рис. 4.1.3.3.13. Представление собственных экспериментальных данных в зависимости D-t в координатах Лайнуивера-Берка ($1/V_0$; $1/[S]_0$) на расстоянии 100 м от Старицкого шоссе

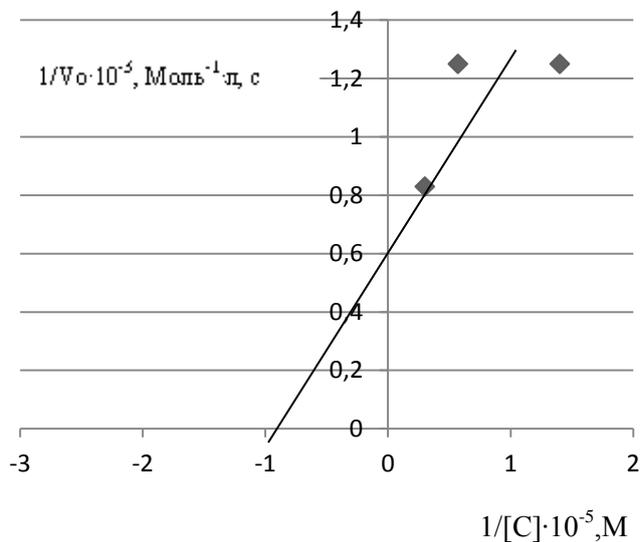


Рис. 4.1.3.3.14. Представление собственных экспериментальных данных в зависимости D-t в координатах Лайнуивера-Берка ($1/V_0$; $1/[S]_0$) на расстоянии 300 м от Старицкого шоссе

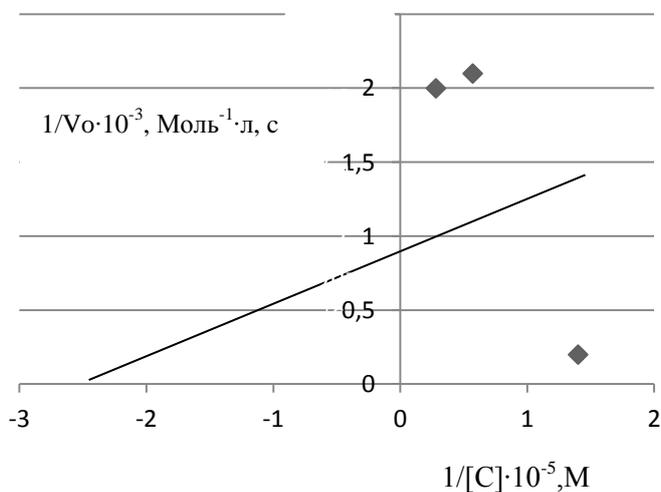


Рис. 4.1.3.3.15. Представление собственных экспериментальных данных в зависимости D-t в координатах Лайнуивера-Берка ($1/V_0$; $1/[S]_0$) на расстоянии 500 м от Старицкого шоссе

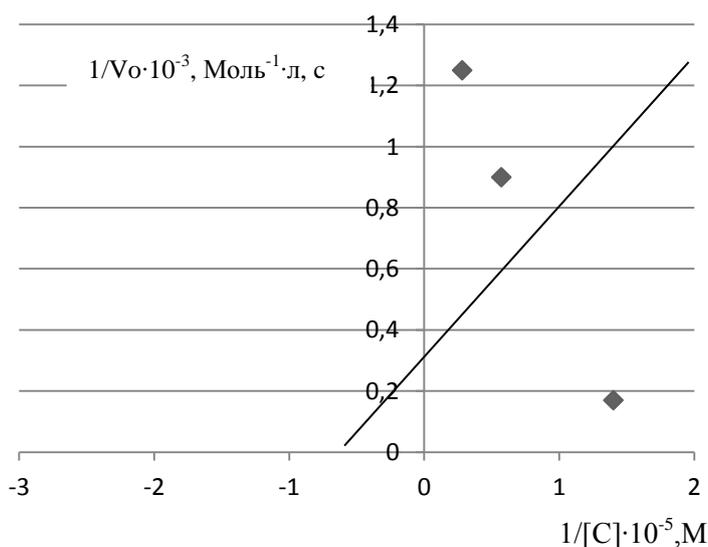


Рис. 4.1.3.3.16. Представление собственных экспериментальных данных в зависимости D-t в координатах Лайнуивера-Берка ($1/V_0$; $1/[S]_0$) на расстоянии 1000 м от Старицкого шоссе

5. По графикам находили ферментативные параметры, и заносили в таблицу:

Таблица 4.1.3.3.1. Ферментативные параметры ПО при варьировании бензидина

L, m	$V_0 \cdot 10^{-3}, c$	$1/V_0, c^{-1}$	$[C] \cdot 10^5, M$	$1/[C] \cdot 10^{-5}, M^{-1}$	$k_M \cdot 10^5, M$	$k_{кат} \cdot 10^3, c^{-1}$	$V_{max} \cdot 10^3, c^{-1}$	$1/V_{max} \cdot 10^{-3}, c$	$1/k_M \cdot 10^{-5}, c$
100	0,7	1428	3,5	0,28	3,3	0,4	1,4	0,7	0,3
	0,2	5000	1,75	0,57					
	7,8	128	0,7	1,4					
300	1,2	833	3,5	0,28	1	0,43	1,6	0,6	1
	0,8	1250	1,75	0,57					
	0,8	1250	0,7	1,4					
500	0,5	2000	3,5	0,28	0,43	0,37	1,25	0,8	2,3
	0,47	2127	1,75	0,57					
	4,1	244	0,7	1,4					
1000	0,8	1250	3,5	0,28	1,6	0,7	3,3	0,3	0,6
	1,1	909	1,75	0,57					
	5,7	1,75	0,7	1,4					

Сравнение с результатами работы Лихуши П.С. за 2008-2015г.г., показало, что значение k_M лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) в 10^2 раз меньше в сравнении с биотканями льна. Другой ферментативной параметр - V_{max} в 10 раз меньше, $k_{кат}$ в 10^6 раз меньше значений этого параметра биотканей льна.

Таблица 4.1.3.3.2. Ферментативные параметры о-ДФО при варьировании концентрации бензидина (Лапина, 2008-2015; Лихуша, 2008)

$k_M \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$V_{max} \cdot 10^2, c^{-1}$
2,27±0,16	135	4,55±0,32

б) Далее были построены графики по трем ферментативным параметрам ($k_M, k_{кат}, V_{max}$):

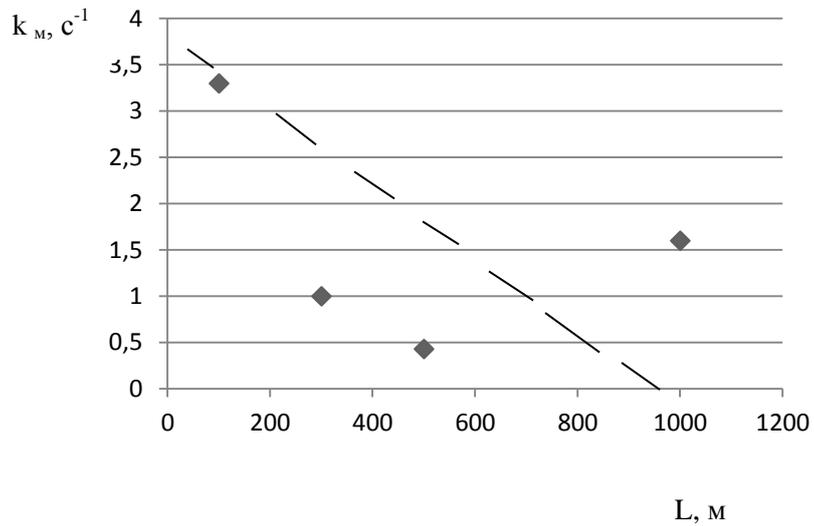


Рис. 4.1.3.3.17. Зависимость k_m от расстояния

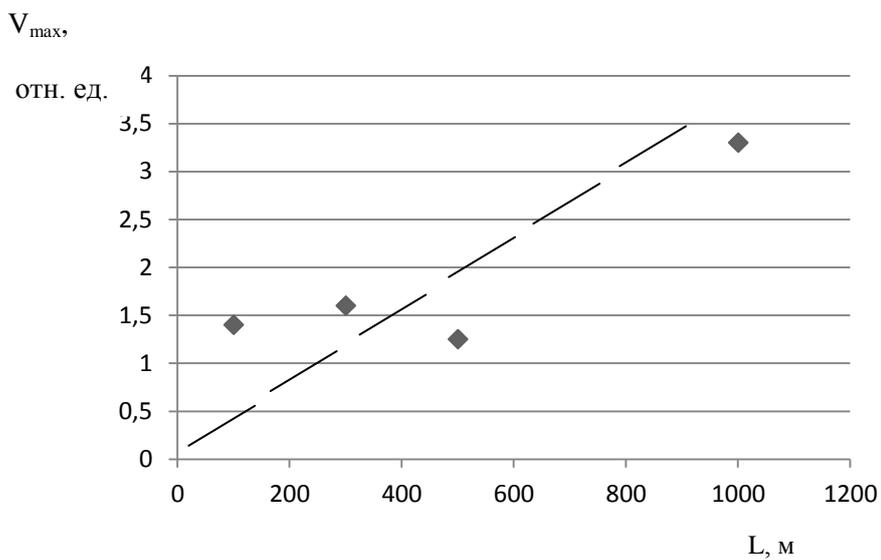


Рис. 4.1.3.3.18. Зависимость V_{max} от расстояния

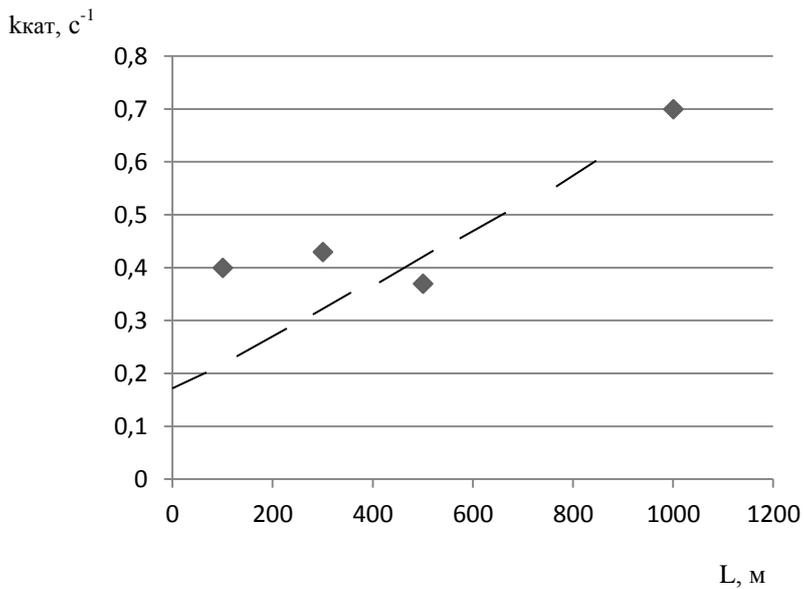


Рис. 4.1.3.3.19. Зависимость $k_{кат}$ от расстояния

Далее установлена следующая зависимость k_m , V_{max} , $k_{кат}$ от расстояния (рис. 4.1.3.3.17; 4.1.3.3.18; 4.1.3.3.19) и проанализировали отдельные изменения этих ферментативных параметров. Известно, что k_m отражает эффективность взаимодействия фермента (E) с субстратом (S). Видно, что значение K_m снижается с увеличением расстояния с 100 до 1000 метров с $3,3$ до $1,6 \text{ с}^{-1}$, в 2 раза, т.е. характеризует двукратное улучшение взаимодействия E с S. Это - экспериментальное доказательство ингибирующей роли выхлопных газов на активность фермента.

Однако следует обратить внимание на другой характер изменений значений $k_{кат}$ и V_{max} , которые возрастают от $1,4$ до $3,3 \text{ с}^{-1}$, в 2,3 раза; $K_{кат}$ от $0,4$ до $0,7 \text{ с}^{-1}$ в, 1,75 раза. Это свидетельствует о том, что пероксидаза лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) при воздействии компонентов выхлопных газов активизируется.

Таков молекулярно-кинетический механизм влияния выхлопных газов на биокатализатор. Следовательно, пероксидазу лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) с полным основанием можно рекомендовать в качестве биоиндикатора для оценки экологического состояния окружающей среды.

4.1.3.4 Выводы

1. Создана и отработана собственная методика выделения пероксидазы из лишайника пармелии бороздчатой (*Parmelia sulcata*) с оригинальными модификациями, включающая использование активированного угля для приготовления экстракта пероксидазы лишайника, обладающего достаточной ферментативной активностью.
2. Экспериментально доказано наличие пероксидазы в изученном биообъекте (лишайнике пармелии бороздчатой).
3. При использовании биуретового метода установлено и обсуждено возрастание концентрации пероксидазы в изученных биообъектах на разных расстояниях (100÷1000 м) от Старицкого шоссе. Выявлены различия кинетики ферментативной реакции пероксидазы в лишайнике (*Parmelia sulcata*) в зависимости от удаленности (100 – 1000 м) биообъектов (образцов лишайника) от Старицкого шоссе.
4. Установлены вариации кинетики ферментативной реакции пероксидазы при разных концентрациях бензидаина в реакционной среде при варьировании расстояний от Старицкого шоссе. Найден комплекс ферментативных параметров и обсуждены изменения k_m , $k_{кат}$, V_{max} в зависимости от удаленности биообъектов (лишайника пармелии бороздчатой) от Старицкого шоссе.
5. Выхлопные газы автомашин в значительной степени влияют на содержание белка и активность пероксидазы лишайника (*Parmelia*

sulcata). Следовательно, изученный объект - лишайник (*Parmelia sulcata*) на основе исследования ферментативных параметров пероксидазы может быть использован в качестве высокочувствительной тестовой биосистемы на экологическую ситуацию в изучаемом районе.

4.1.3.5 Список литературы

1. Бязров Л. Г. Лишайники в экологическом мониторинге /Л. Г. Бязров. – М., 2002. – 336 с.
2. Н.Н.Сажина, Н.П.Храмеева, Т.И.Кузичкина, Н.М.Евтеева, И.Н.Попов, Г.П.Лапина, В.М.Мисин, Волков В.А. Различные модельные системы, используемые для количественного анализа антиоксидантов в виноградных винах. Плюсы и минусы. Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине. Материалы Международной научно-практической конференции/ Ч.1., Новосибирск, ФГБОУ ВПО «НГПУ», 2013. С. 244-246.
3. Волков В.А., Н.Н.Сажина, Н.П.Храмеева, Т.И.Кузичкина, Н.М.Евтеева, Г.П.Лапина, В.М.Мисин. Проблема выбора оптимальной модельной системы для количественного анализа антиоксидантов в виноградных винах. Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты. Международная конференция молодых ученых и VI школа им. академика Н.М. Эмануэля: лекции и тезисы/ В.М.Мисин Москва, Российский университет дружбы народов, 2013. С. 234-235.
4. Волков В.А., Сажина Н.Н., Лапина Г.П., Мисин В.М., Исследование антирадикальных и восстановительных свойств как метод контроля качества и пищевой ценности виноградных вин. Качество и экологическая безопасность пищевых продуктов и производств. Материалы Международной научной конференции с элементами научной школы для молодежи. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2013.С. 106-107.
5. Голдовская Л.Ф. Химия окружающей среды: Учебник для вузов. – М.: Мир, 2005. – 296 с.
6. Золотарева Н.В., Лапина Г.П., О роли алкогольдегидрогеназы в виноделии. Качество и экологическая безопасность пищевых продуктов и производств. Материалы Международной научной конференции с элементами научной школы для молодежи. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2013. С. 122-125.
7. Зенова Г. М. Лишайники // Соросовский образовательный журнал. - 1999.№8.- с.30-34
8. Ильин В.Б., Сысо А. И. Микроэлементы и тяжелые металлы в почвах и растениях Новосибирской области. Новосибирск: Из-во СО РАН, 2001. С. 30-31.

9. Илькун Г.М. Загрязнители атмосферы и растения / Г.М. Илькун. – Киев: Наукова думка, 1978. – 246 с.

10. Калверт С. Защита атмосферы от промышленных загрязнений / С Калверт, Г. Инглунд. – М.: Металлургия, 1988. – 286 с.

11. Козловская Ю.В., Лапина Г.П., Исследования иммобилизованной формы альбуминов льна. Симбиоз-Россия 2012. Материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых. - Тверь, изд-во «Заповедник Времени», 2012. С. 188-192.

12. Козловская Ю.В., Лапина Г.П. Влияние ионной силы водного раствора на адсорбируемость альбуминов семян льна. Материалы конференции «Применение поверхностно-активных веществ в сельском хозяйстве: производство и переработка сельхозпродукции». – Белгород: Белгор. гос. ун-т, 2009. – С. 52-54.

13. Козловская Ю.В., Лапина Г.П. О поверхностной активности альбуминов льна при варьировании ионной силы водной среды. Вестник Тверского государственного университета, серия «Биология и экология». Тверь: Твер. гос. ун-т, – 2009 – № 34. С. 88–91.

14. Косулина Л.Г. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды / Л.Г. Косулина, Э.К. Луценко, В.А. Аксенова. – Ростов н/Д : Изд-во Рост. ун-та, 1993. – 240 с.

15. Лапина Г.П. Элементы кинетики ферментативных реакций. - Тверь: ТвГУ, 1998. - 66 с.

16. Лапина Г.П. Пероксидазы растений и гидролазы: структурные и регуляторные свойства: Монография. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. – 116 с.

17. Лапина Г.П., Кинетика структурообразования иммобилизованных ферментативно-активных белков лизоцима и α -химотрипсина на жидких границах раздела. Восьмые Курдюмовские чтения «Синергетика в естественных науках»: материалы Международной междисциплинарной научной конференции с элементами научной школы для молодежи. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2012. – 116 с.

18. Лапина Г.П., Волков В.А., Евтеева Н.М., Сажина Н.Н., Мисин В.М., Прямые и непрямые методы в исследовании антиоксидантной активности вин. Современная химическая физика. XXIV Конференция: сборник тезисов. – М.: «Парк-медиа», 2012. С. 335.

19. Лапина Г.П., Золотарева Н.В., Использование трехмерной K_m' V' -системы координат для анализа данных по ферментативной кинетике. Вестник Тверского государственного университета, серия «Биология и экология». – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2010. – С. 71-76.

20. Лапина Г.П., Ипполитов К.Г., Волков В.А., Определение количества антиоксидантов в образцах белых столовых виноградных вин. Проблемы теоретической и экспериментальной химии. Тезисы докладов XXII

Российской молодежной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения А.А.Тагер. – Екатеринбург, изд-во Уральского ун-та, 2012.С. 189.

21. Лапина Г.П., Суворов В.В., Волков В.А., Экспериментальный метод выявления образцов подсолнечного масла с наибольшим количеством антирадикальных антиокислителей. Проблемы теоретической и экспериментальной химии: тезисы докладов XXII Российской молодежной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения А.А. Тагер. – Екатеринбург, изд-во Уральского ун-та, 2012. С. 190.

22. Лапина Г.П., Суворов В.В., Волков В.А., Эффективный экспериментальный метод выявления образцов подсолнечного масла с наибольшим количеством антирадикальных антиокислителей. Проблемы теоретической и экспериментальной химии. Тезисы докладов XXII Российской молодежной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения А.А.Тагер. – Екатеринбург, изд-во Уральского ун-та, 2012.С. 55.

23. Лапина Г.П., Козловская Ю.В., Имобилизованные альбуминовые белки семян льна. «Биотехнология: наука и практика». Материалы докладов научно-практической конференции - Воронеж, ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», 2012.- 48-50 с.

24. Лапина Г. П., Руденко И. В. Различные аспекты влияния выхлопных газов на лишайник (*Parmelia sulcata*) // Материалы XI научной конференции аспирантов, магистрантов и студентов, апрель 2013 года: сб. ст. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2013. - 84-85 с.

25. Лапина Г.П., Золотарева Н.В. Оптимизация метода ферментативной реакции с участием алкогольдегидрогеназы печени лошади при варьировании концентрации никотинамидадениндинуклеотида. Вестник Тверского государственного университета, №14, серия «Биология и экология». Выпуск 13. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. – С. 85-90.

26. Лапина Г.П., Золотарева Н.В. Пирацетам – регулятор каталитической активности алкогольдегидрогеназы печени лошади. Вестник Тверского государственного университета, №2, серия «Биология и экология». Выпуск 11. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. – С. 59-64.

27. Лапина Г.П., Парфентьева Н.В. Изменение каталитических характеристик Алкогольдегидрогеназы при введении в ферментативную систему фармпрепаратов пирацетам, зорекс и унитиол. Вестник Тверского государственного университета. Серия «Биология и экология». 2014. № 1. С. 75-79. (РИНЦ, ВАК, 0.034).

28. Лапина Г.П., Лихуша П.С., Подбор оптимальных материалов в качестве носителя для иммобилизованной ортодифенолоксидазы. Материалы докладов научно-практической конференции «Биотехнология: наука и

практика». - Воронеж, ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», 2012. 78-79 с.

29. Лапина Г.П., Лихуша П.С., Закономерности хода ферментативной реакции, катализируемой о-дифенолоксидазой льна при варьировании ионной силы раствора. Вестник Тверского государственного университета, серия «Биология и экология». – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2010. № 20. С. 23-26.

30. Лихенология : учеб.-метод. пособие / А. В. Лиштва. – Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2007. – 121 с.

31. Лихуша П.С., Лапина Г.П. Зависимость ферментативных параметров о-дифенолоксидазы льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L) от ионной силы раствора. Вестник Тверского государственного университета, серия «Биология и экология». Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. № 15. С. 92-98.

32. Лихуша П.С., Лапина Г.П. Иммобилизация о-дифенолоксидазы льна // Вестник Тверского государственного университета. Серия «Биология и экология». 2014. Выпуск 3. № 25. С.27 -30. (РИНЦ, ВАК, 0.034).

33. Лихуша П.С. Ферментативные характеристики орто-дифенолоксидазы биотканей льна. Магист. дисс. - Тверь: ТвГУ, 2008. – 67-68 с.

34. Лапина Г.П., Гаевская В.В., Лихуша П.С. Пероксидаза печеночницы благородной (*HEPATICA NOBILIS*) // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2015. № 2. С. 30-35.

35. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях: Учебник/ под ред. Г. И. Квеситадзе - М.: Наука, 2005.-198 с.

36. Мокроносов А.Т. Фотосинтез: физиолого-экологические и биохимические аспекты / А.Т. Мокроносов, В.Ф. Гавриленко. – М., 1992. – 236 с.

37. Неверова О.А. Активность пероксидазы как показатель дитоксикационного потенциала древесных растений в зоне выбросов автотранспорта. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т.11, No1 (3), 384 с.

38. Николайкин, Н.И. Экология / Н.И. Николайкин, Н.Е. Николайкина, О.П. Мелехова.– М.: Дрофа, 2003. – 624 с.

39. Трасс Х. Х., Лихеноиндикационная оценка степени загрязненности атмосферной среды Южного Прибайкалья / Х. Х. Трасс, А. Й. Пярн, Цобель // Уч. зап. Тарт. гос. ун-та. – Тарту, 1988. – Вып. 812. – 32–46.

40. Павлова Е. И., Экология транспорта. Учебник для вузов. - М.: Транспорт, 2000. - 248 с.

41. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов.-Спб.: ГНОРД, 2004. - с.240

42. Романова А.К. Физиолого-биохимические признаки и молекулярные механизмы адаптации растений к повышенной концентрации CO₂ в

атмосфере / А.К. Романова // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, №1. -с. 123-132.

43. Серегин И. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения// Физиология растений.2002. Т. 48. № 4. С. 606-630.

44. Счастьева Е.С., Лапина Г.П. Каталитические характеристики пероксидазы в процессе созревания теста. Материалы конференции Пятые Юбилейные Курдюмовские чтения «Синергетика в естественных науках». – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. – Ч. I. – С. 167-168.

45. Трахтенберг И.М., Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты / И.М. Трахтенберг, В.С. Колесников, В.П. Луковенко. – Минск: Наука и техника, 1994. – 286 с.

46. Жизнь растений. В 6-ти т. Гл. ред. чл. -кор. АИ СССР, проф. А. А. Федоров. Т.3. Водоросли. Лишайники. Под ред. проф. М. М. Голлербаха. М., «Просвещение», 977. 487 с, ил.

47. Шарилина Н.С., Лапина Г.П. Влияние ионной силы раствора на ферментативные параметры пероксидазы льна. Вестник Тверского государственного университета, №2, серия «Биология и экология». Выпуск 11. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. – С. 74-79.

48. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г,А. Практикум по общей биохимии, под общей редакцией Ю.Б. Филипповича. М.: «Просвещение». -1975.-318 с.

49. Якушкина Н. И., Физиология растений: учеб. для студентов // Н. И. Якушкина, Е. Ю. Бахтенко. — М., 2005. — 463 с.

50. Сайт «ecosystema.ru», Строение лишайников [Электронный ресурс]. - Электрон. дан. – Режидоступа:<http://www.ecosystema.ru/08nature/lich/i02.htm>

III. Береза бородавчатая (*Bétula verrucósa*)

1. Распространение и экология, ботаническое описание

Объектом исследования служили листья растения береза бородавчатая (лат. *Bétula verrucósa*). Материал для исследования был отобран по обочине трассы Москва-Санкт-Петербург (Бологовский район). На расстоянии 5, 10, 50, 100, 500 м и 1 км от автомагистрали.

Берёза бородавчатая (лат. *Bétula verrucósa*) — вид растений рода Берёза (*Betula*) семейства Берёзовые (*Betulaceae*).

Другие русские названия вида: берёза повислая, берёза плакучая, берёза повисшая; берёза европейская белая.

Широко распространённая лесообразующая порода, формирующая мелколиственные леса по всем климатическим зонам, кроме тундры; однако берёзовые леса по большей частью не являются коренными, а возникают на месте сведённых лесов, в первую очередь хвойных. Чаше связана с бедными, хорошо дренированными почвами. Так как берёза светолюбива, легко вытесняется более долгоживущими и крупными деревьями; во многих случаях присутствует в лесах только как примесь, по более светлым участкам.

Имеет обширный ареал в Европейской части России (от тундры до степей), растёт в Западной Сибири, на Алтае и Кавказе.

За пределами России распространена почти по всей Европе, за исключением Пиренейского полуострова, в Северной Африке, в Передней и Центральной Азии. Из видов берёз имеет наибольший ареал. В горы эта берёза поднимается до высоты 2 100—2 500 м над уровнем моря. Интродуцирована повсюду в зоне умеренного климата.

Ботаническое описание

При благоприятных условиях достигает 25—30 м в высоту и до 80 см в диаметре. Корневая система берёзы сильно развита, но проникает в почву неглубоко, поэтому деревья нередко подвергаются ветровалу. Кора у молодых деревьев коричневая, а с 8—10 лет белеет. Молодые особи можно спутать с видами ольхи. Во взрослом состоянии хорошо отличается от других деревьев по белой коре. У более старых деревьев кора в нижней части ствола становится глубокотрещиноватой, чёрной.

Древесина желтовато-белая, плотная и тяжёлая. Ветки голые, покрыты многочисленными густорассыпчатыми смолистыми желёзками-бородавочками (отсюда и произошли названия берёза бородавчатая и берёза плакучая). Молодые ветви повисают вниз, что придаёт кроне берёзы очень характерный облик (название — берёза повислая). Крона ветвистая, но не густая, ветвление симподиальное.

Листья от ромбически-яйцевидных до треугольно-яйцевидных, 3,5—7 см длины, 2—5 см ширины, заострённые на верхушке с ширококлиновым или почти усечённым основанием, гладкие, в молодом возрасте клейкие; края двоякозубчатые. Черешки голые 0,8—3 см. Почki сидячие.

Цветки правильные, мелкие, невзрачные, однополые, собраны в серёжчатые, повисающие соцветия на концах веточек. Цветёт до распускания листьев (по некоторым источникам — одновременно с распусканием листьев).

Мужские цветки на коротких цветоножках, расположены по 3 дихазиально в пазухах красно-бурых кроющих чешуй и образуют на концах удлинённых побегов прошлого года по 2—4 свисающие (5—6 см)

мужские серёжки. Околоцветник простой, одно- двулистный, 2—4 тычинки раздвоенные, противостоят листочкам околоцветника.

Женские цветки без околоцветника, с двумя брактелями, сросшимися трёхлопастной кроющей чешуей. Они собраны по 5 в дихазии на укороченных боковых побегах и формируют короткие, цилиндрические, зелёные женские серёжки (шишковидные тирсы). Гинецей из двух сросшихся плодолистиков. Завязь нижняя, в завязи развивается по одному семязачатку. Нитевидные рыльца длинные, выставяющиеся, нередко ярко окрашенные.

Берёза повислая в свободном состоянии начинает плодоносить с 10 лет, а в насаждении — с 20—25 лет. Плодоношение продолжается ежегодно. Плоды созревают к концу лета и начинают рассеивание. Рассеивание происходит постепенно в течение всей осени и зимы. В берёзовом лесу может выпадать ежегодно до 35 кг берёзовых семян на 1 га. Плод — мелкий крылатый орешек.

В отличие от берёзы пушистой, берёза повислая — очень светолюбивая порода.

Сравнительно недолговечна, живёт до 120 лет, реже до более взрослого возраста.

Целью настоящей работы было изучение активности пероксидазы листьев берёзы бородавчатой (*Betula verrucosa*) в присутствии HNO_3 в разных концентрациях.

Для реализации цели работы выполнены следующие задачи:

- выделение пероксидазы из листьев берёзы бородавчатой;
- определение концентрации фермента;
- определение ферментативных параметров;
- выделение аминокислот из биообъекта методом тонкослойной хроматографии.

2. Экспериментальные доказательства использования фермента пероксидазы берёзы бородавчатой (*Betula verrucosa*) в качестве тестового объекта для оценки экологического состояния окружающей среды

2.1. Выделение пероксидазы из листьев берёзы бородавчатой (*Betula verrucosa*)

Пероксидазу выделяли из листьев берёзы бородавчатой в полном соответствии с методикой, предложенной Ю.Б. Филлиповичем. В надосадочной жидкости находится пероксидаза. Для дальнейшего

исследования определяли концентрацию с использованием калибровочной кривой (рис. 2.1.1).

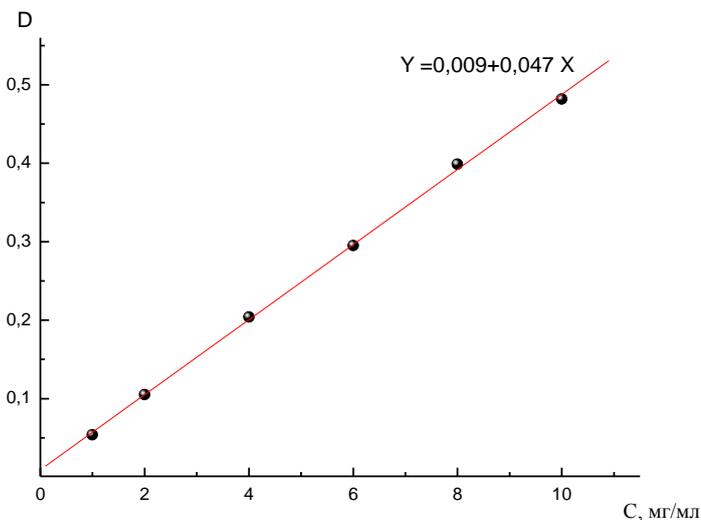


Рис.2.1.1 График зависимости оптической плотности водных растворов САЧ от их концентрации (Лихуша П.С., 2008).

2.2. Определение количества белка по методу биуретовой реакции

Поскольку пероксидаза – фермент белковой природы в изучаемом эксперименте использовали метод биуретовой реакции: анализировали систему, состоящую из биуретового реактива с добавлением экстракта растительного материала.

С использованием калибровочной кривой (рис.2.1.1) рассчитана концентрация суммарных белков (табл.2.2.1, рис.2.2.1, рис. 2.2.2.).

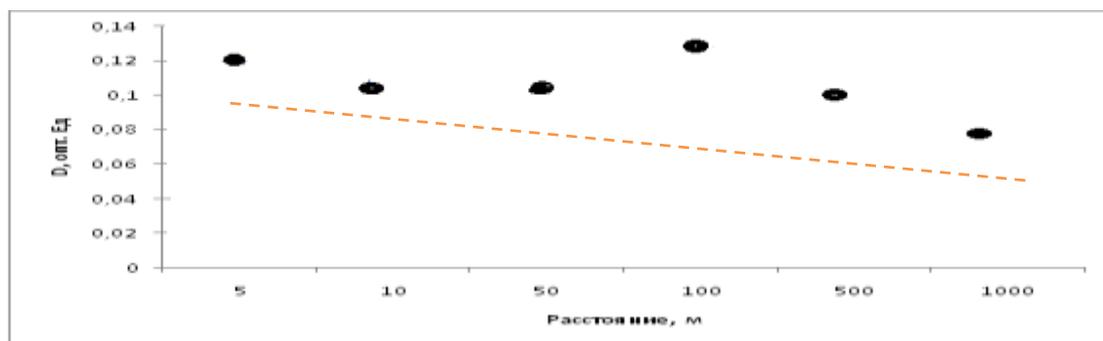


Рис.2.2.1. График зависимости оптической плотности от удаленности от автомагистрали.

Таблица 2.2. 1.

Зависимость концентрации пероксидазы от удаленности от автомагистрали

Удаленность от автомагистрали, м	Значение D, опт. ед.	Значение C, мг/мл
5	0,12	2,8
10	0,113	2,5
50	0,112	2,3
100	0,13	2,1
500	0,1	1,9
1000	0,078	1,3

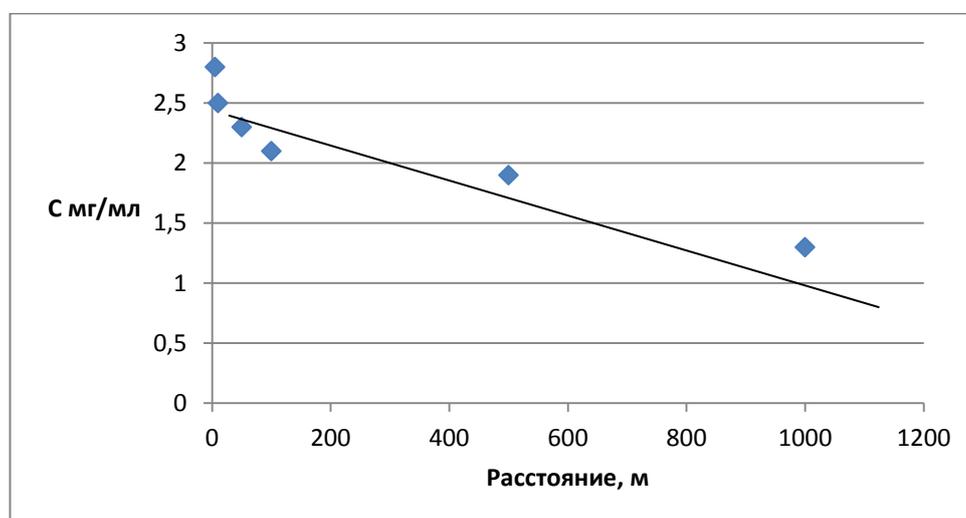


Рис.2.2.2. График зависимости концентрации пероксидазы от расстояния

Видно, что по мере удаления от автомагистрали, а именно на расстоянии до 1000м, наблюдается выраженная тенденция к снижению содержания пероксидазы в листьях берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*).

2.3. Определение ферментативных параметров по методу Бояркина

Ферментативные параметры измеряли по методу Бояркина. Для этого проводилась серия замеров изменения оптической плотности реакционной смеси через каждые 15 с при $\lambda = 540$ нм. Данная смесь состояла из экстракта, ацетатного буфера, бензидина и перекиси водорода.

В связи с тем, что в работе достоверно выявлено снижение содержания пероксидазы в листьях березы бородавчатой (*Bétula verrucósa*), представляет интерес выявить, как влияет один из компонентов выхлопных газов (HNO_3 разных концентраций) на активность фермента.

Для решения этой задачи выполнен следующий алгоритм программы:

1. Построение кривые в координатах D-τ (рис. 2.3.1.-2.3.5.).
2. Обработаны начальные участки кривых (V_0 ферментативных реакций)
3. Построены кривые в координатах $1/V_0 - 1/[S]_0$. В качестве субстрата была взята H_2O_2 разных концентраций.

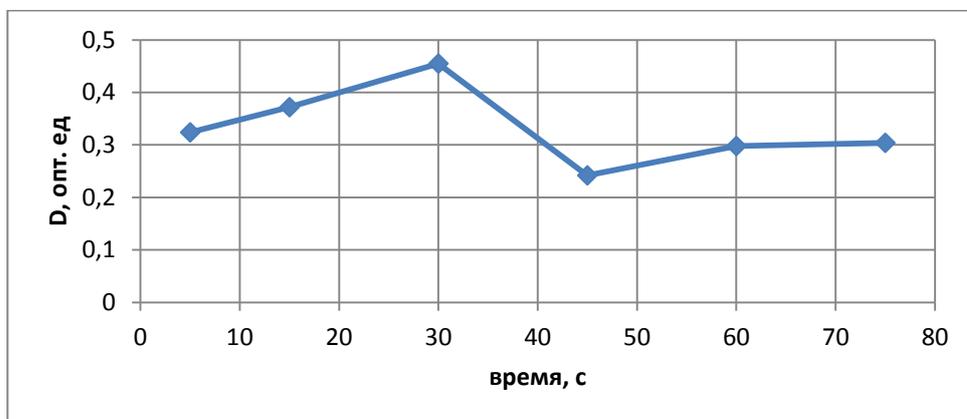


Рис.2.3.1. Зависимость «D-τ» при концентрации пероксида водорода $6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

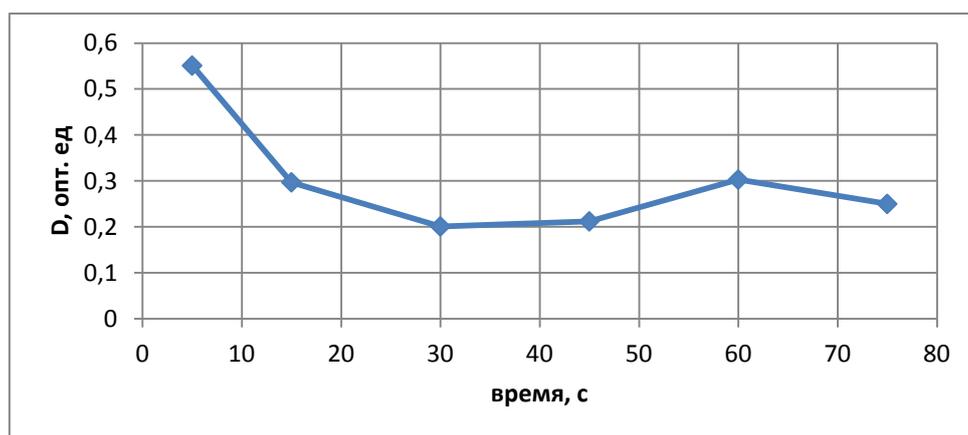


Рис. 2.3.2. Зависимость «D-τ» при концентрации пероксида водорода $8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

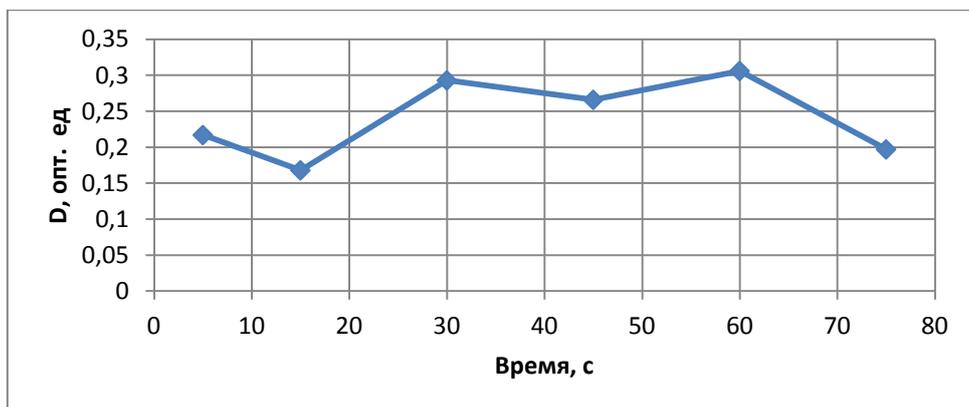


Рис. 2.3.3. Зависимость «D-τ» при концентрации пероксида водорода $10 \cdot 10^{-3}$ М

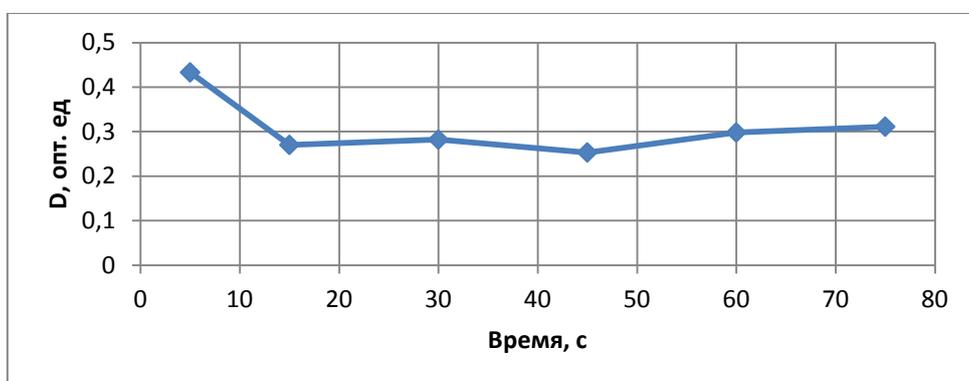


Рис. 2.3.4. Зависимость «D-τ» при концентрации пероксида водорода $12 \cdot 10^{-3}$ М

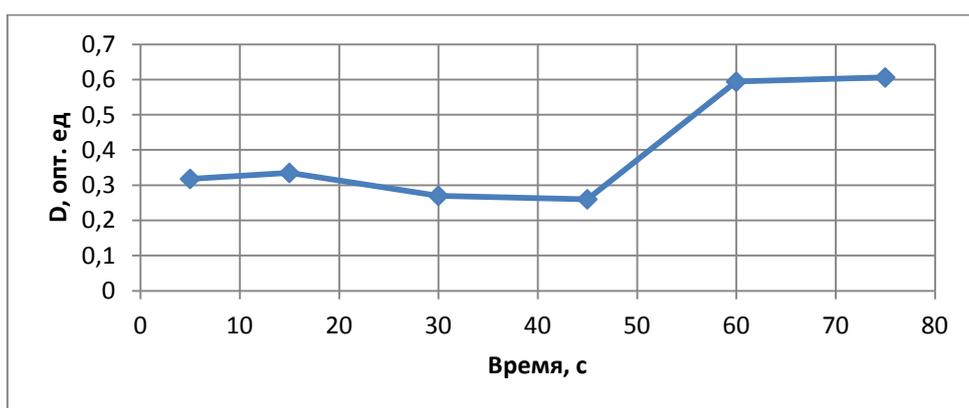


Рис. 2.3.5. Зависимость «D-τ» при концентрации пероксида водорода $14 \cdot 10^{-3}$ М

Полученные графические изображения представлены в координатах двойных обратных величин (рис. 2.3.6.).

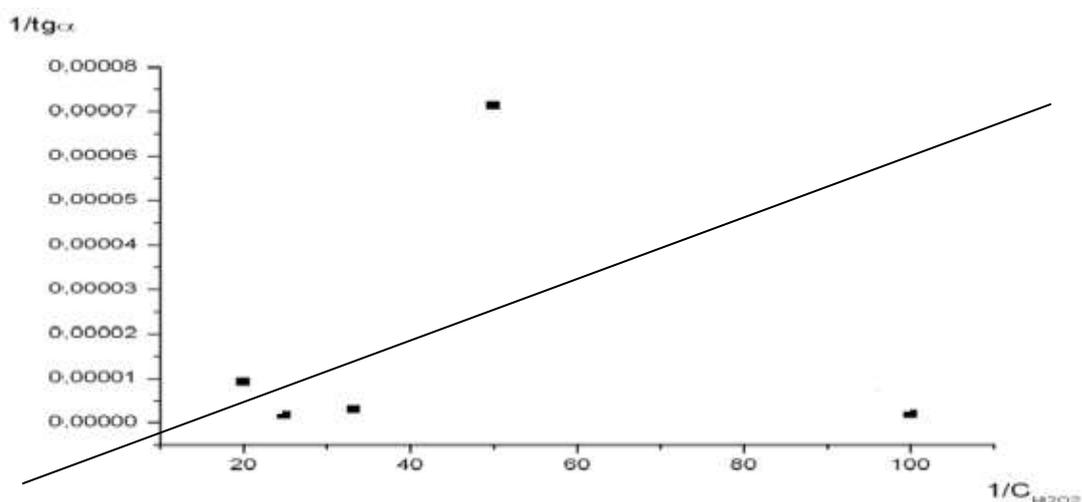


Рис. 2.3.6. График в координатах двойных обратных величин « $1/tg\alpha-1/C$ »

Обработка начальных участков кинетических зависимостей D-т позволила рассчитать значения ферментативных параметров ПО, которые приведены в табл. 2.3.1. В качестве контроля взят коммерческий препарат пероксидазы хрена, в качестве анализируемой системы взята пероксидаза, выделенная из листьев берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*) с добавлением разных концентраций азотной кислоты.

Таблица 2.3.1.

Ферментативные параметры пероксидазы берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*)

	К м, моль \ л	К кат, $\cdot 10^{-5}$, с $^{-1}$	V max* 10^{-5} , отн. Ед
ПО контроль	0,035	33	0,165
О раст+ HNO ₃ (конц)	0,606	1282	6,41
ПО раст + HNO ₃ (разб)	0,909	3252	16, 26
ПО листьев берёзы бородавчатой	0,05	0, 66	33

Видно, что взаимодействие ПО с HNO_3 в значительной степени влияет на соединение в активном центре и взаимодействие фермента E с субстратом S, уменьшая этот параметр (K_M) в 2- 26 раз. В то же время ослабление взаимодействия ПО с субстратом усиливает в $10^2 - 10^3$ раз катализ ($K_{\text{kat}}, V_{\text{max}}$). Это - классический пример конкурентной активации ПО.

Можно предположить, что пероксидаза берёзы чувствительна в отношении одного из компонентов выхлопных газов - HNO_3 . Этот установленный в работе экспериментальный факт позволяет утверждать, что пероксидаза листьев берёзы может служить биоиндикатором по отношению этого компонента (HNO_3) не только в выхлопных газах, но и в других субстанциях. Кроме того, полученные собственные данные по пероксидазе листьев берёзы делают возможным сформировать молекулярный механизм влияния HNO_3 разных концентраций на ферментативное поведение этого биокатализатора.

2.4. Выделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

Представляло особый интерес выяснить аминокислотный состав листьев берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*). Для этого выделяли смесь свободных аминокислот из листьев берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*) методом тонкослойной хроматографии. Для исследования взяты 6 образцов, взятые на разных (м) расстояниях (5, 10, 50, 100, 500 и 1000) от автомагистрали.

Положение зоны вещества на хроматограмме характеризуется величиной R_f , которая равна отношению расстояния от стартовой линии до центра зоны вещества к расстоянию от стартовой линии до линии фронта.

Значение R_f - величина постоянная для данного соединения в данной системе и зависит от ряда условий: способа элюирования, качества и активности сорбента, толщины слоя, качества растворителей, количества нанесенного вещества, длины пробега растворителей, положения стартовой линии и почти не зависит от температуры. По этой величине проводят идентификацию компонентов в смеси.

$$R_f = \frac{a}{b}$$

где a - расстояние от центра пятна пробы до стартовой линии, мм; b - расстояние от фронта растворителя до стартовой линии, мм.

В данной работе получились следующие данные по значениям R_f и числу свободных аминокислот.

Таблица 2.4.1. Результаты по свободным аминокислотам листьев березы бородавчатой (*Bétula verrucósa*)

Удаленность биообъектов от автомагистрали, м	Число свободных аминокислот	Наименование свободных аминокислот	Значение Rf
5	2 (см. образец 1)	Пролин	4,12
		Аспарагин	16,5
10	1 (см. образец 2)	Пролин	4,26
50	2 (см. образец 3)	Пролин	4,50
		Аспарагин	4,84
100	3 (см. образец 4)	Пролин	4,69
		Аспарагин	5,45
		Цистеин	8,71
500	7 (см. образец 5)	Пролин	3,80
		Аспарагин	11,40
		Цистеин	3,16
		Серин	11,40
		Аргинин	6,33
		Валин	2,47
		Глутамин	4,07
1000	4 (см. образец 6)	Пролин	3,84
		Аспарагин	10,00
		Цистеин	3,84
		Серин	11,40

Хроматограммы образцов №1-6 приведены в приложении.

На основе полученных данных, построили график зависимости числа аминокислот в листьях березы бородавчатой от удаленности от автомагистрали.

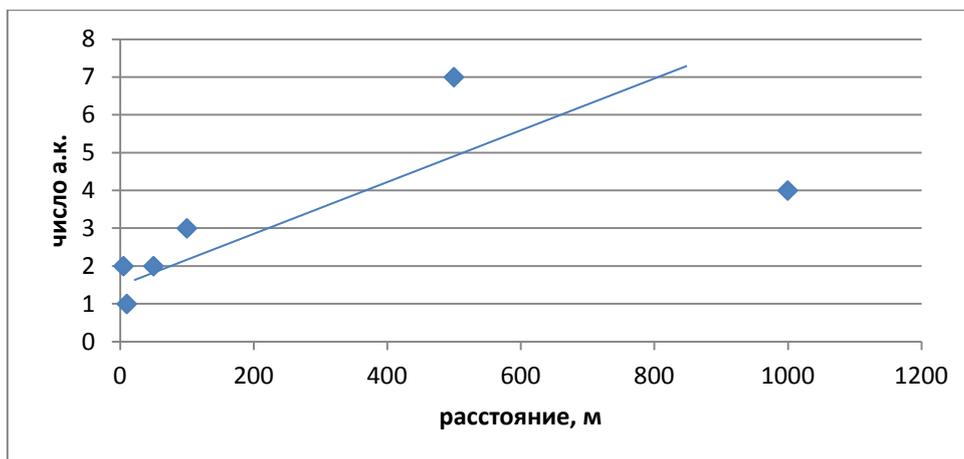


Рис.2 4.1. Зависимость числа аминокислот от удаления от автомагистрали

Видно (рис.2.4.1.), что по мере удаленности от автомагистрали число свободных аминокислот возрастает в ~ 3 раза. Можно предположить, что биосинтез свободных аминокислот в листьях берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*) ингибируется в большей степени вблизи автомагистрали. На расстояниях, близких к 1000 м, угнетающее действие компонентов выхлопных газов становится значительно меньше.

Известно, что свободные аминокислоты необходимы для синтеза всех белков, включая и ферменты, ответственных за рост и развитие растений. Найденная зависимость (рис.2.4.1.) убеждает в ингибирующем характере действия не только HNO_3 , но и других компонентов выхлопных газов на этот параметр.

2.3. Выводы

1. Установлено, что по мере удаленности от автомагистрали, а именно на расстоянии до 1000 м, наблюдается тенденция к снижению концентрации пероксидазы в листьях берёзы бородавчатой (*Bétula verrucósa*). Выявлено снижение концентрации фермента, но одновременно установлено повышение его активности.

2. Определены и рассчитаны значения ферментативных параметров (K_m и $K_{кат}$) пероксидазы листьев берёзы бородавчатой, удовлетворительно коррелирующие с литературными данными.

3. Определён аминокислотный состав листьев березы бородавчатой. Выявлено, что по мере удаления от автомагистрали число аминокислот в исследуемых образцах возрастает, что связываем с усилением биосинтеза суммарных белков (и пероксидазы в том числе) в отсутствии негативного влияния компонентов выхлопных газов.

2.6. Список литературы

1. <http://ecosystema.ru/> – сайт экологического центра «Экосистема»
2. <http://bibliofond.ru/> – некоммерческий информационный портал. Электронная библиотека
3. Болбас М.М., Савич Е.Л., Кухаренок Г.М., Поклад Л.Н. Экология и ресурсосбережение на транспорте. – Минск: 2011. – 295 с.
4. Александров В.Ю., Кузубова Е.П., Яблокова Е.П. Экологические проблемы автомобильного транспорта. // Аналитический обзор – Новосибирск, 1995. – 82-83 с., 113 с.
5. Основы аналитической химии. В 2 кн. Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др.; Под ред. Ю.А. Золотова. - М.: Высш. шк., 1996.- 119с.
6. Бухарина И.А. Ведерников К. Е. Эколого-биологические особенности древесных растений в урбанизированной среде, монография, 2007г.
7. Краткая химическая энциклопедия. Гл. редактор И. Л. Кнунянц М.: Советская энциклопедия, 1961.
8. Берёзов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 2004, 623 с.
9. Энциклопедический словарь-справочник. Окружающая среда. - М.: Прогресс-Пангея, 1993.-98с
10. Малов Р. В. Автомобильный транспорт и защита окружающей среды. М.:Транспорт, 1988.- 67-68с.
11. Якубов Х.Г., Ананьев П.Б. Санитарно-гигиеническое значение зеленых насаждений в условиях города // Экология большого города: Альманах. Вып. 3. Проблемы содержания зеленых насаждений в условиях Москвы. - М.: Прима-Пресс, 1998. - 152 с.
12. Дьяков А.Б., Игнатъев Ю.В., Копшин Е.П. и др. Экологическая безопасность транспортных потоков. – М.: Транспорт, 1989. – 178 с.5
13. studfiles.ru
14. Луканин В.Н., Буслаев А.П., Трофименко Ю.В. Автотранспортные потоки и окружающая среда. – М.: ИНФРА-М, 1998. – 408 с.
15. Новиков Ю.В. Экология, окружающая среда и человек. - М., 1998. - 242 с
16. [http:// www.dissercat.com/](http://www.dissercat.com/)
17. Захаров В.М. Приоритеты национальной экологической политики России. – М.: ЛЕВКО, 2009. – 122 с.

18. Илькун, Г.М. Газоустойчивость растений: вопросы экологии и физиологии. – Киев 1971; Гудериан Р. Загрязнение воздушной среды.- М.: Мир, 1979. – 200 с.
19. Илькун Г.М. Газоустойчивость растений: вопросы экологии и физиологии. – Киев , 1971; Неверова, 2001. – 133с.
20. Welinder K.G., Smillie L.B., Schonhaum G.R. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. I. Tryptic peptides // *Canad. J. Biochem.* — 1972. — Vol. 50. — N 1.- P. 44-62.
21. Strickland E.H. Circular dichroism of horseradish peroxidase and its enzyme-substrate compounds// *Biochem. Biophys. Acta.* — 1968. — Vol. 151. — N 1. — P. 70-75.
22. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П. Пероксидазный катализ и его применение. М.: МГУ, 1981. — 92 с.
23. Савицкий А.П., Угарова Н.Н., Березин И.В. Роль гема в формировании третичной структуры пероксидазы из хрена. Взаимосвязь между флуоресценцией и третичной структурой фермента // *Биоорганическая химия.* — 1977. — Т. 3. — № 9. — С. 1242-1249.
24. Araiso T., Dunford H.B. Horseradish peroxidase. XXXVI. On the difference between peroxidase and metmyoglobin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1979. — Vol. 89. — N 2. - P. 520-524.
25. Siegel B.Z., Galston A.W. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase// *Science.* - 1967. - Vol. 157. — N 3794. - P. 1557-1559.
26. Haschke R.H, FriedhoffJ.M. Calcium-related properties of horseradish peroxidase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1978. — Vol. 80. — N 4. — P. 1039-1042.
27. Строев Е.А. Биологическая химия. М.: Высш. шк, 1986. — С.44—45.
28. Клячко Н.Л. Регуляция ферментов структурой и природой матрицы в микрогетерогенных системах на основе агрегатов поверхностно-активных веществ. Дисс. док. хим. наук. М.: МГУ, 1990. — 223 с.
29. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. — 129 с.
30. Pang A, CatessonA-M., Francesch C, Rolando C, Goldberg R. On substrate specificity of peroxidases involved in the lignification process // *J. Plant Physiol.* — 1989. — Vol. 135. - N 2. - P. 325-331.
31. Gripshover B., Morre D.J., Boss W.F. Fractionation of suspension cultures of wild carrot and kinetics of membrane labeling // *Protoplasma.* — 1984. — Vol. 123. — N 1. — P. 213-217.

32. Fry S.C. Formation of isodityrosine by peroxidase isozymes // J. Exp. Bot. — 1987. — Vol. 38. - N 3. - P. 853-859.
33. Роговина В.В., Муравьева Р.А., Фомина В.А., Муштакова В.М. Peroxidазосомы клеток растений // Изв. РАН. Сер. биол. — 1996. — № 1. — С. 16—22.
34. Рогожин В.В., Курилюк Т. Т. Влияние ультрафиолетового облучения семян на процессы перекисного окисления липидов в проростках пшеницы // Биохимия. — 1996. - Т. 61. - № 8. - С. 1432-1439.
35. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. — 347 с.
36. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи соврем. биологии. — 1993. — Т. 113. — №4.- С. 456-470.
37. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Влияние антиоксидантов (дигоксина, квер-цетина и аскорбиновой кислоты) на каталитические свойства пероксидазы хрена // Биохимия. — 1998в. - Т. 63. — № 6. — С. 781-786.
38. Рогожин В.В. Перекисное окисление липидов является инициатором пусковых механизмов прорастания семян // Тезисы докладов IX Международный симпозиум по кормовым растениям «Эколого-популяционный анализ кормовых растений естественной флоры, интродукция и использование»^ 17—20 августа 1999). Коми, Сыктывкар, 1999. С. 170-171.
39. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. Пер. с англ. М.: Мир, 1986. 393 с.
40. Рубин Б.А. Курс физиологии растений, М., Высшая школа, 1976.- 90-93с.
41. Методы выделения, очистки, количественного определения и исследования физико-химических свойств белков и ферментов. – К.: Изд-во Калинин. Гос. Ун-та, 1982, Ч. 1. – 30 с. , Ч. 2. – 32 с.
42. Филиппович Ю.Б. 4-е изд., перераб. и доп. - М: Агар, 1999. - 512 с.
43. Лихуша П.С. Магистерская диссертация, Ферментативные параметры о-дифенолоксидазы биотканей льна, Тверь, 2008.
44. Алесковский В.Б., Бардин В.В., Булатов М.И. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство.- Л.: Химия, 1988.
45. Громова М.Ю. Материалы XI научной конференции аспирантов, магистрантов и студентов, апрель 2013 года: сб.ст.-Тверь: Твер. гос.ун-т, 2013.-68-69 с.

IV. Печеночница благородная

Печеночница благородная, или Печеночница обыкновенная (лат. *Hepatica nobilis*) — травянистое зимнезелёное растение; вид рода Печеночница (*Hepatica*) семейства Лютиковые. Это многолетнее растение достигает в высоту 5—15 см. Корневище тёмно-коричневое, несущее на верхушке продолговато-яйцевидные, буроватые чешуйки. Стебли в виде стрелок, расположенных в пазухах прошлогодних листьев или чешуек, прямостоящие, чаще несколько изогнутые, опушённые тонкими, прилегающими или большей частью прямостояще оттопыренными волосками, большей частью красноватые или коричневые. Листья — прикорневые, многочисленные, кожистые, перезимовывающие, расположены на длинных черешках, в очертании почковидные или широко-треугольные, при основании сердцевидные, до середины трёхнадрезанные, с широкояйцевидными, тупыми или заострёнными лопастями, с верхней стороны тёмно-зелёные, с нижней — имеют фиолетовый оттенок, в молодом состоянии одетые, как и черешки, густыми, мягкими, шелковистыми волосками, на черешках оттопыренными, позднее теряющие своё опушение, начинают развиваться весной лишь после цветения растения. Листочки покрывала в числе трёх, до 1 см длиной, сидячие, яйцевидные, туповатые или тупые, цельнокрайние, рассеянно или довольно густо прижато-волосистые, придвинутые почти вплотную к основанию цветка и похожие на чашелистики. Цветки — одиночные, прямостоящие, в диаметре до 2 см. Околоцветник состоит из 6—7 листочков, узкояйцевидных, на конце закруглённых, синевато-лиловых (снаружи более бледно окрашенных), реже белых или розовых, с обеих сторон голых, опадающих. Тычинки с белыми или розоватыми тычиночными нитями и почти белыми пыльниками с красноватым связником. Рыльца головчатые. Цветение — апрель — май. Плод — продолговатая, волосистая семянка, расположенная на утолщённом выпуклом цветоложе. Размножается исключительно семенами. В оптимальных условиях зацветают на третий год.

Распространение:

Северная Европа: Дания, Финляндия, Норвегия, Швеция;

Центральная Европа: Австрия, Чехословакия, Германия, Польша, Швейцария;

Южная Европа: Албания, Болгария, Югославия, Италия, Румыния, Франция (включая Корсику), Испания;

территория бывшего СССР: Белоруссия, Европейская часть России, Украина, Приморье;

Азия: Китай, Япония (Хонсю), Корея.

Растёт по лиственным лесам, кустарникам, реже открытым луговым местам.

Значение и использование:

Ранее растение считалось лекарственным, применялось как вяжущее средство. Употреблялось также в качестве суррогата чая. Разводится в садах как декоративное растение.

2. Печеночница благородная в Твери

Занесена в Красную книгу Тверской области (Сорокин, 2002) как вид с сокращающейся численностью (статус 2 – уязвимый вид).

По территории Тверской области проходит юго-восточная граница ареала вида. Малотребовательна к механическому составу и плодородию почв, но нуждается в умеренном увлажнении. Избегает крайне сухих и заболоченных местообитаний. Обладает слабой конкурентной способностью и доминирует лишь в местах, лишенных сплошного напочвенного покрова (отсюда ее заметная приуроченность к задровым равнинам и склонам оврагов, особенно подверженным процессам денудации). Может долго сохраняться в ельниках и сравнительно быстро исчезать в широколиственных лесах.

Лимитирующие факторы.

Изменение экологических условий в результате хозяйственной деятельности (подтопление при устройстве водоемов, вырубки и осветления лесов и т.п.); сбор населением в букеты; естественные процессы смены покрова в ходе сукцессий.

Меры охраны.

Соблюдение режима ООПТ. Запрет рубки лесных участков с массовым развитием в покрове печеночницы; запрещение сбора в букеты.

3. Экологическое картирование

Любые процессы, происходящие на поверхности Земли, могут быть представлены как комплекс взаимодействий различных элементов среды, поэтому, наиболее точным и подробным наблюдением принято считать одновременное наблюдение за множеством параметров. Такую возможность предоставляет экологическое картографирование, или картирование, имеющее возможность отобразить одновременно несколько параметров на одной карте.

Экологическое картирование – совокупность методов, приемов и процессов создания экологических карт и атласов в аналоговой или цифровой формах. Экологическое картирование охватывает все компоненты окружающей среды: рельеф, воды суши и моря, воздух, почвы, растительный и животный мир, а также условия жизни и деятельности людей. В соответствии с этим по тематике различают отраслевое экологическое картирование (эколого-геохимическое, медико-экологическое, ландшафтно-экологическое, эколого-демографическое и т.д.) и комплексное экологическое картирование — эколого-географическое и геоэкологическое (геолого-экологическое). Суть комплексного системного экологического картирование состоит в картографическом моделировании экосистем, их компонентов, структурных особенностей, внутренних и внешних связей, динамики, функционирования.

Крупномасштабное экологическое картирование выполняется полевыми методами, а составление средне- и мелкомасштабных карт проводится в лабораторных условиях. Источниками служат результаты полевых съемок, контактных наблюдений и замеров, картографические материалы, аэро- и космические снимки, данные статистической отчетности и стационарных гидрометеорологических наблюдений, нормативные данные, теоретические закономерности и литературные источники (Берлянт, 2002).

В настоящее время еще нет полной согласованности в методике и принципах составления эколого-географических карт, на основе которых можно проанализировать состояние окружающей среды. Это связано с системностью содержания данных карт: картограф-составитель вынужден обращать внимание не только на свойства того или иного объекта, но и на взаимоотношения между объектом (или объектами) и средой (Стурман, 2003).

По А.М. Берлянту, сформировались направления экологического картографирования :

1. Оценочное картографирование природных и социально-экономических условий формирования экологической обстановки.
2. Картографирование антропогенных (техногенных) воздействий на природную среду и прогноз их развития.
3. Картографирование устойчивости среды к внешним воздействиям.
4. Картографирование экологического состояния среды, степени ее нарушенности, факторов риска.

5. Медико-экологическое и рекреационно-экологическое картографирование.

6. Оценочно-прогнозное картографирование экономических и социальных последствий ухудшения экологической безопасности.

Одно из важных направлений составляет оперативное экологическое картирование, т.е. создание карт в автоматическом или полуавтоматическом режимах в реальном или близком к реальному масштабам времени с целью быстрого (своевременного) информирования пользователя о меняющейся экологической ситуации. Методы цифрового картирования имеют целью создание электронных карт и атласов с помощью автоматических картографических систем и специального программного обеспечения на основе баз цифровых экологических данных. Результаты представляются в виде экологических карт, экологических атласов, а также баз цифровых экологических данных.

В целом последовательность этапов разработки карт экологических ситуаций включает 5 этапов:

1. Определение субъекта оценки и картографирование, масштаб исследования;

2. формулировка цели (постановка задачи, выбор критериев оценки);

3. определение территориального каркаса, территориальных единиц (индивидуальное районирование – проблемные ареалы);

4. оценка (оценивание выявленных территориальных единиц по благоприятности их свойств для данного субъекта), разработка оценочных шкал, проведение оценивания;

5. разработка картографической модели, знаковых систем, проектирование легенды, пояснительных текстов и т.п.

С учетом наличия исходной информации, разработаны два алгоритма составления карт экологических ситуаций: при отсутствии необходимых количественных данных и при достаточном информационном обеспечении. Оба варианта предполагают представление исходной информации в картографической форме в виде одномасштабных карт. В первом случае используются аналитические (географические) экспертные оценки, во втором – метод формализованных оценок (Кочуров, Шишкина, 2009).

Описывая какое-либо явление или территорию, очень важно соблюдать порядок от общего к частному, т.е. дать сначала характеристику основных, определяющих черт, затем детально проанализировать отдельные особенности. В заключение четко

формулируются выводы. Всякое научное описание должно быть логично, строго упорядочено, построено по определенному плану.

Основные принципы, которым должно удовлетворять научное описание, составляемое по картам (Исаченко, 1990):

- логичность, упорядоченность и последовательность описания;
- отбор и систематизация фактов;
- введение в описание элементов сравнения, аналогии, сопоставления с использованием количественных показателей;
- оценка описываемых явлений или процессов с точки зрения конкретных задач исследования;
- четкая формулировка выводов и рекомендаций.

Результаты экологического картографирования успешно применяются в экологическом проектировании. В настоящее время значительное число карт вошло в перечни материалов, обязательных или рекомендуемых для включения в пакет документов экологического обоснования инвестиций на разных стадиях инвестиционного процесса. По результатам инженерно-экологических изысканий составляется технический отчет.

На карте современного экологического состояния должны быть отображены: распространение различных типов ландшафтов, функциональное зонирование территории, расположение различных типов источников и их характеристики, возможные пути миграции и участки аккумуляции загрязнений, расположение особо охраняемых участков и зон ограниченного использования, участков особой чувствительности к воздействиям опасных природных и техногенных процессов, результаты геохимических, гидрохимических и радиационных исследований, оценка современного экологического состояния территории и районирование по условиям экологического благополучия природной среды (Молчанов, Смирнов, 1967).

На карте прогнозируемого экологического состояния в зависимости от видов и характера воздействий и особенностей природных условий следует отображать динамику предполагаемого распространения различных типов и видов загрязнений; ожидаемые изменения ландшафтной структуры территории, морфоструктуры ландшафтов, отдельных компонентов окружающей среды, общих оценок территории по степени экологического благополучия природной среды (Кочуров, 2003).

Экологические карты должны сопровождаться развернутыми легендами, необходимыми разрезами и другими дополнениями.

Допускается составление единой экологической карты современного экологического состояния территории с элементами прогноза, а так же вынос информации на вспомогательные карты.

4. Экспериментальные доказательства использования фермента пероксидазы печеночницы благородной (*Нерatica nobilis*) в качестве тестового объекта для оценки экологического состояния окружающей среды.

4.1. Составление карт наличия исчезающего вида – печеночницы благородной (*Нерatica nobilis*) в черте города Твери (Первомайская роща и роща в микрорайоне Мигалово)

Исследованы следующие территории на наличие исчезающего вида (Бигон, 1989; Исаченко, 1990; Сукачев, 2001; Хазиев, 2003; Уткин, 2004) – печеночницы благородной (*Нерatica nobilis*) в черте города Твери (рис. 1): Комсомольская роща, роща в микрорайоне Мигалово (рис. 2), первомайская роща (рис. 3), окрестности ТЭЦ-3 (Соминка), лесопарковая зона в Мамулино.

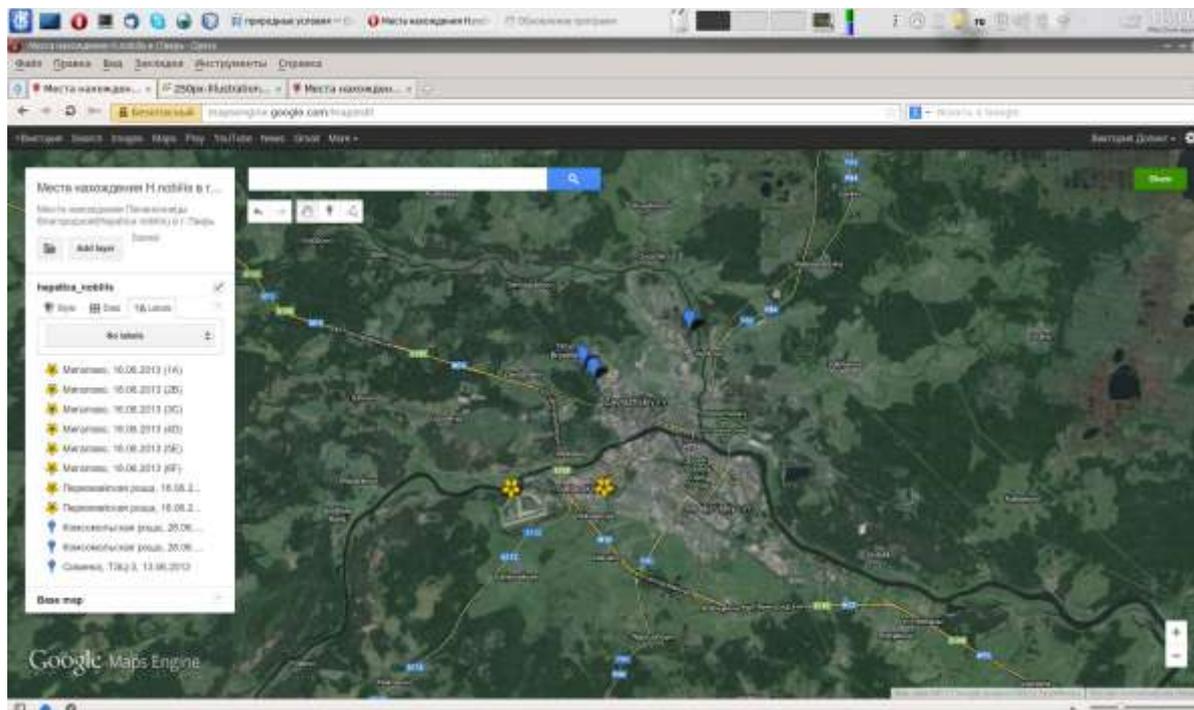


Рис.1. Распространенность в г.Тверь. Синие указатели — печеночница не обнаружена, желтые — обнаружена



Рис.2. Печеночница в Мигалово.

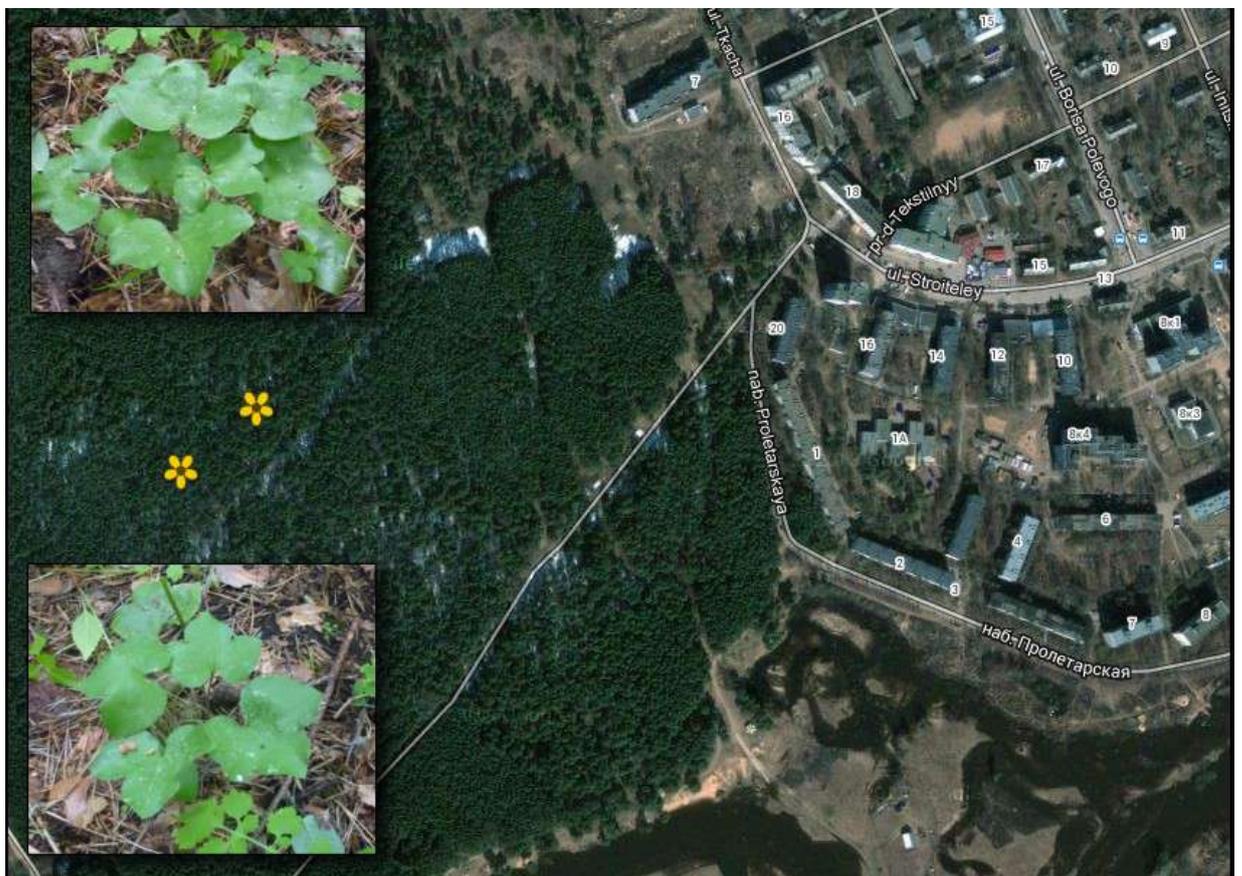


Рис.3. Печеночница в Первомайской роще.

Картографический метод исследования (Герасимов, 1975; Берлянт, 2002; Стурман, 2003) – это метод использования карт для познания изображенных на нем явлений. Познание подразумевает под собой изучение по картам структуры, взаимосвязей, динамики и эволюции явлений во времени и пространстве, прогноз их развития, получение всевозможных качественных и количественных характеристик.

Техника описания проста (Молчанов, 1967), но, тем не менее, подчинена некоторым обязательным требованиям. Приступая к описанию, необходимо, прежде всего, оценить качество самой карты, серии карт или атласа, получить представление об их современности, детальности, принципах составления, характере искажений, вызываемых картографической проекцией. Следует изучить легенду, уделяя главное внимание принципам классификации изображаемых явлений и самим способом изображения.

Составлены карты местностей, где обнаружена печеночница благородная (*Hepatica nobilis*) – Первомайская роща и роща в микрорайоне Мигалово (рис. 1-3).

Обнаружена печеночница в Мигалово и Первомайской роще. Сообщество: сосняк разнотравный. Четко выделяются 4 яруса: 1 ярус – деревья, 2 ярус – молодые подростки, кустарнички, 3 ярус – травянистое покрытие, кустарнички, 4 ярус – мох. Сосна обыкновенная, осина обыкновенная, береза белая, рябина обыкновенная, липа европейская; ландыш, хвощ, папоротник, чистотел, крапива, сныть, кислица, режухна – земляника.

Печеночница в Мигалово растет на обширных территориях, с массовым развитием в покрове, популяциями по 14-20 кустов. Встречаются популяции с количеством кустов более 20.

В Первомайской роще найдено всего 4 куста. Сделанные мною фотографии и составленные на этой основе карты (см. рис. 1-3) дают вполне определенную картину, а именно, такая локализация печеночницы, считаем, связана с различием в структуре леса (разные ярусы: древостой, подлесок, травяной или травяно-кустарничковый ярус).

В месте выявления ее обитания преобладает затененность и увлажненность покрова, что может быть связано со специфическими экологическими условиями – лесные пожары, сбор в букеты (вид обладает определенными декоративными свойствами), интенсивная эксплуатация местности отдыхающими и т.д.

Возможные причины исчезновения печеночницы, считаем, связаны, в основном, со сбором в букеты, неправильной эксплуатацией территорий (вытаптывание травяного яруса, вырубки, замусоривание), где произрастает данный вид (Печеночница благородная — *Hepatica nobilis*).

Для более глубокого изучения был предпринят молекулярный подход в изучении пероксидазы печеночницы благородной. Именно такой подход используется в современной экологии. Для этого были подобраны и использованы методики и методические подходы, разработанные Лапиной Г.П. (Лапина, 1999 – 2015) определения ферментативной активности пероксидазы.

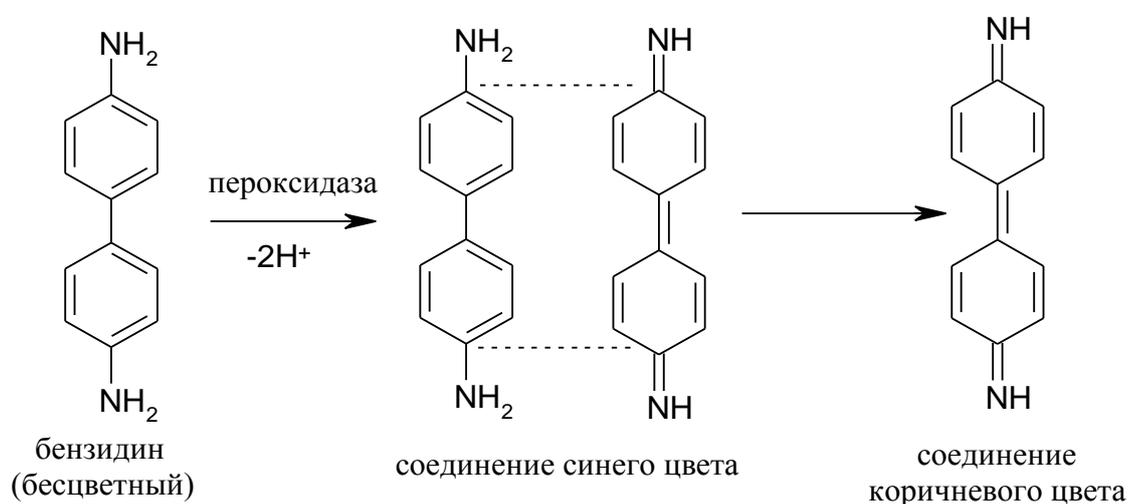
Получено подтверждение тому, что выявлено в Красной книге (Сорокин, 2002), что печеночница благородная (*Hepatica nobilis*) является исчезающим видом (Казеев, 2003; Радкевич, 1998) со статусом 2 (уязвимый вид).

Исследованные территории дают вполне определенную картину: выявленная локализация печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*) связана с различием в структуре леса, в местах ее обитания; поскольку преобладает затененность и увлажненность покрова.

4.2 Молекулярно-кинетические методы определения ферментативной активности пероксидазы печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*)

Метод определения комплекса ферментативных параметров (константы Михаэлиса - K_M , максимальной скорости - V_{max}) ферментативной кинетической активности пероксидазы (Клёсов, 2008) печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*).

При окислении бензидина образуется восстановленное соединение синего цвета, количество которого определяли фотометрически при $\lambda=540$ нм. Уравнение химической реакции с участием пероксидазы дано ниже:

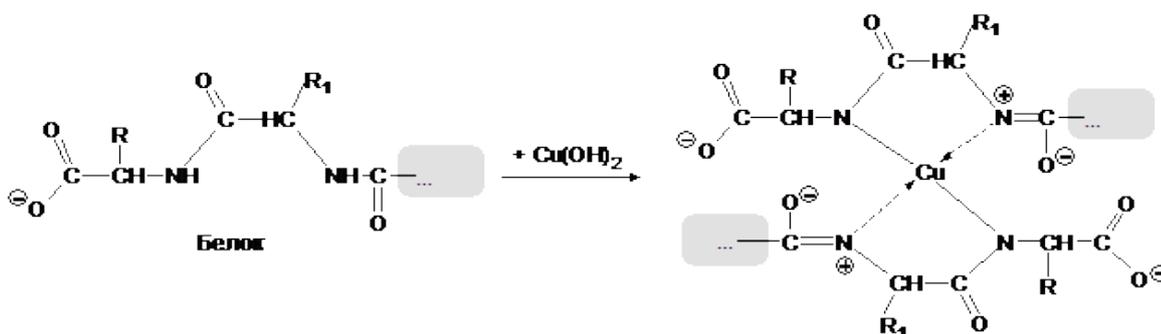


Для исследования скорости биокатализа измеряли увеличение значения величины оптической плотности (D) при длине волны 540 нм во времени (τ) в течение 2-3 мин хода ферментативной реакции.

Метод Лайнуивера–Берка (Северин, 2008) для обработки данных по ферментативной кинетике и расчета важнейших ферментативных параметров: K_M – константы Михаэлиса, V_{max} – максимальной скорости реакции.

В ходе ферментативной реакции (Степановских, 2001; Чакчир, 2002; Строев, 2006) рассчитывали начальные скорости реакций по зависимостям оптической плотности (D) во времени (t). Далее осуществляли построения в координатах Лайнуивера–Берка ($1/V$ и $1/[S]$) и вели расчет важнейших ферментативных параметров – K_M , V_{max} .

Метод биуретовой реакции (Николаев, 2007) был выбран для количественного определения содержания пероксидазы в экстракте. Известно, что в щелочной среде ионы меди образуют с белками комплексы фиолетового цвета. Интенсивность окрашивания в определённых пределах пропорциональна концентрации белка, которая устанавливается по интенсивности светопоглощения при 540-560 нм фотометрически.



В экспериментальной программе (Ленинджер, 1985) по исследованию пероксидазы (Clementi, 1969) печеночницы благородной (*Herpaticia nobilis*) (Андреева, 1988;) был применён многоступенчатый подход, а именно:

- 1) выделение пероксидазы из тканей растения;
- 2) очистка полученного экстракта;
- 3) определение содержания активного фермента (Шугалей, 1986);
- 4) расчёт ферментативных параметров (Nessel, 1977);
- 5) анализ и обсуждение полученных параметров.

Поиск оптимальных условий для проведения каталитической реакции требовал исследования модельной ферментативной системы:

пероксидаза печеночницы, бензидин ($5 \cdot 10^{-3}$ М), при варьировании концентраций H_2O_2 $(2-8) \cdot (10^{-4}$ М) с шагом в единицу, $t=25^\circ\text{C}$, рН 5,3.

Первый этап. Выделение фермента пероксидаза печеночницы благородной (*Herpaticia nobilis*) из биотканей (листья и стебли растений) вели по схеме, показанной на рис.4.2.1.

4 г ткани растений печеночницы гомогенизировали в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера ($I = 0,35$ М), содержащего $1,5 \cdot 10^{-2}$ М бензойной кислоты и $1 \cdot 10^{-2}$ М аскорбиновой кислоты (рН 5,3). Гомогенат отжимали, оставляли на 15 мин при периодическом перемешивании, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 минут. Осадок отбрасывали. К надосадочной жидкости добавляли сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 20% насыщения. Через 3 часа осадок собирали центрифугированием при 5000 об/мин, его отбрасывали, в надосадочной жидкости – пероксидаза.

Метод биуретовой реакции

Готовят биуретовый реактив, растворяя последовательно в мерной колбе на 250 мл 0,375 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 1,5 г сегнетовой соли ($\text{KООС-СНОН-СООNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) в 150 мл воды. Приливают медленно при постоянном перемешивании 75 мг 10%-ного раствора гидроксида натрия и доводят содержимое до 250 мл водой. Биуретовый реактив не подлежит длительному хранению в стеклянной посуде.



Рис. 4.2.1. Схема выделения и очистки пероксидазы из биоматериала печеночницы благородной (*Herpaticia nobilis*) по методу В.Д. Анисимова и Т.Б. Кастальевой (1978)

Далее определяли важнейшие ферментативные параметры – K_M и V_{max} . Для этого изучали кинетику хода биокаталитической реакции по изменению величины оптической плотности (D) во времени (τ) для изучаемой системы. В качестве примера представлены зависимости $D \sim \tau$ для водного раствора пероксидазы, входящего в состав изучаемой системы (рис. 4.2.2.).

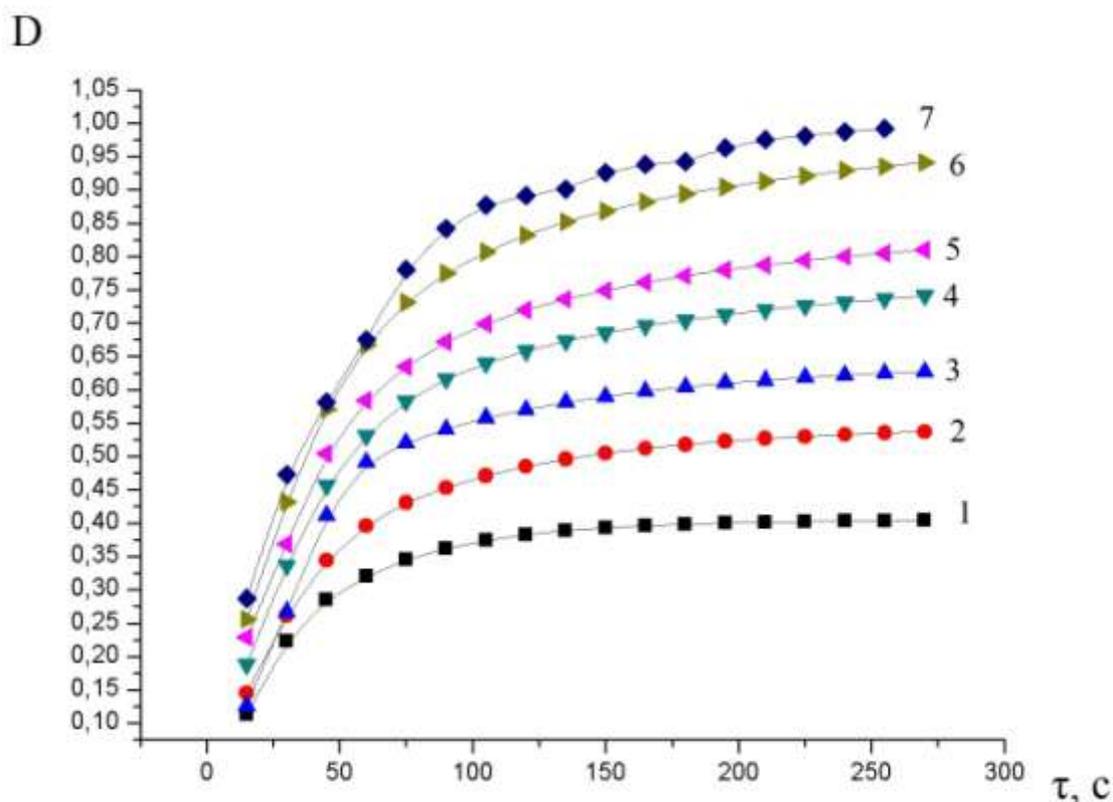


Рис.4.2.2. Зависимости « D - τ » для изучаемой системы при варьировании концентрации пероксида водорода (2-8)·(10^{-4} М) с шагом в единицу: **1**: $2 \cdot 10^{-4}$ М; **2**: $3 \cdot 10^{-4}$ М; **3**: $4 \cdot 10^{-4}$ М; **4**: $5 \cdot 10^{-4}$ М; **5**: $6 \cdot 10^{-4}$ М; **6**: $7 \cdot 10^{-4}$ М; **7**: $8 \cdot 10^{-4}$ М

На основе кинетических зависимостей D - τ для изучаемой системы (рис. 4.2.2.) рассчитаны начальные скорости (V_0) пероксидазозависимых ферментативных реакций (V_0), далее проведено спрямление в координатах двойных обратных величин : $1/V$ и $1/[S]$ (координатах Лайнуивера-Берка) (рис.4.2.3.).

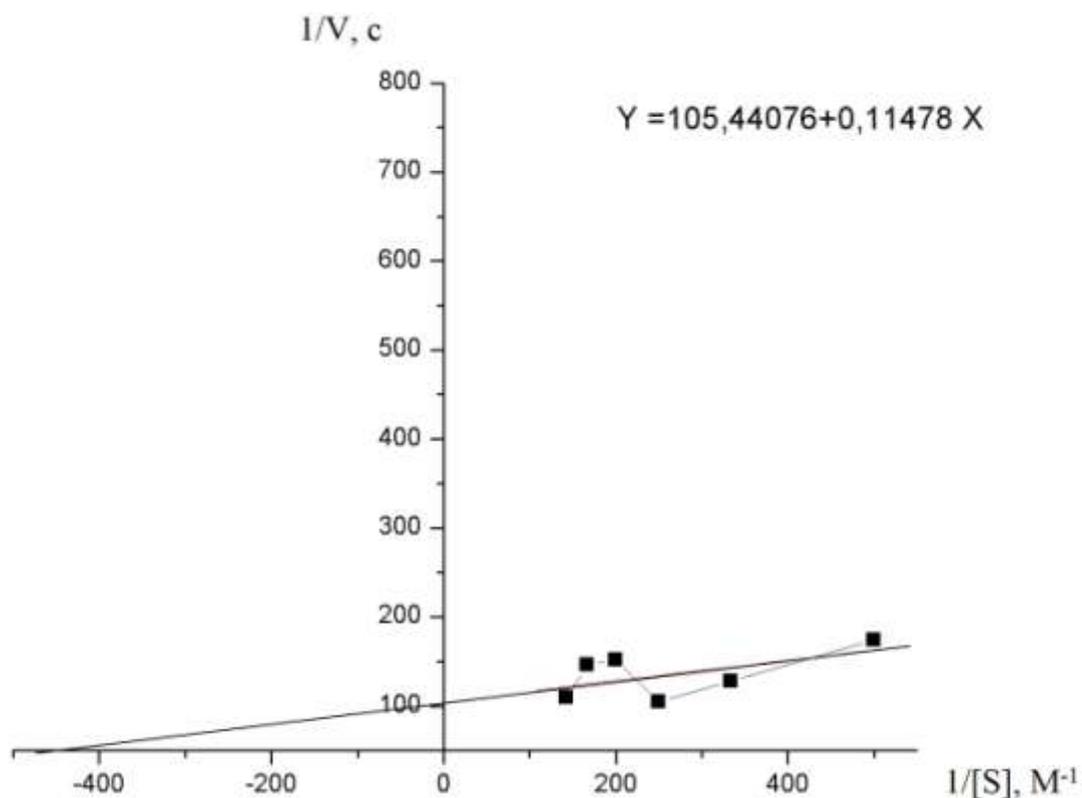


Рис. 4.2.3. 6. Спрявление кинетических зависимостей в координатах двойных обратных величин – координатах Лайнуивера-Берка ($1/V$ - $1/[S]$) для изучаемой системы.

На втором этапе работы определены кинетические параметры каталитической активности пероксидазы в изучаемой системе: бензидин ($5 \cdot 10^{-3}$ М), при варьировании концентраций H_2O_2 $(2-8) \cdot (10^{-4}$ М). По отработанной схеме построены спрявленные кинетические зависимости в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 4.2.3.) и рассчитаны параметры K_M и V_{max} .

$$K_M = 2,23 \cdot 10^{-3} \text{М};$$

$$V_{max} = 9,52 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}.$$

Экспериментально определенные значения ферментативных параметров - K_M и V_{max} – для исчезающего вида печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*) находятся в полном соответствии с данными литературы (Лапина Г.П., Лихуша П.С., 2010-2014 гг.). Это позволяет считать пероксидазу печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*) тестовым ферментом при изучении разного рода (благоприятных и неблагоприятных) воздействий на экологическое состояние лесопарковых зон (Кочуров, 2003, 2009; Крылов, 2004).

Проведено выделение и очистка пероксидазы из биотканей печеночницы, подтверждена гомогенность выделенного биокатализатора. Рассчитано содержание фермента (5,32 мг/мл г/г сырой ткани). Исследованы важнейшие ферментативные параметры биокатализатора в рамках разработанного многоэтапного научно-методического подхода по изучению каталитических свойств пероксидазы в модельных системах в присутствии регуляторов каталитической активности: определены значения важнейших ферментативных параметров каталитической активности пероксидазы из биотканей печеночницы благородной: $K_M = 2,23 \cdot 10^{-3}$ М, $V_{max} = 9,52 \cdot 10^{-3}$. Полученные характеристики согласуются с данными литературы (Strickland, 1968; Srivastava, 1977; Лапина, 2010-2015), что указывает на достоверность полученных параметров.

4.3. Выводы

1. Проведено картирование районов г. Твери (Первомайская роща и роща в микрорайоне Мигалово) с целью выявления мест обитания печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*). Различная локализация растения, считаем, может быть связана с:

- с различием в структуре леса, в местах ее обитания (поскольку преобладает затененность и увлажненность покрова);

- с экологическими условиями – лесные пожары, сбор в букеты (вид обладает определенными декоративными свойствами), а также интенсивной эксплуатацией местности отдыхающими.

2. Подтверждено, что печеночница благородная (*Hepatica nobilis*) является исчезающим видом со статусом 2 (уязвимый вид).

3. Предпринят молекулярно-кинетический подход на основе изучения ферментативных параметров пероксидазы печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*), включающий:

- выделение и очистку пероксидазы из изучаемого объекта – печеночницы благородной (*Hepatica nobilis*);

- расчет начальных скоростей реакций по зависимостям оптической плотности (D) во времени (t);

- осуществление построения в координатах Лайнуивера–Берка;

- расчет важнейших ферментативных параметров – K_M , V_{max} .

4. Показано, что пероксидаза печеночницы благородной (*Herpaticia nobilis*) может быть выбрана в качестве тестового фермента для изучения экологического состояния лесопарковых зон.

4.5. Список литературы

Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений / В.А.Андреева. – М.: Наука, 1988. – С. 7–24.

Березов Т.Т. Биологическая химия. Москва, 1990, 528 с., стр. 92 - 131.

Берлянт А. М. Картография: Учебник для вузов. — М.: Аспект Пресс, 2002. — 336 с.

Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология. Особи, популяции и сообщества / Пер. с англ. М.: Мир, 1989.Т.1.

Биохимия, под редакцией проф. Е.С. Северина, 5-ое издание, Москва, 2008, 768 с., стр. 74 – 118.

Герасимов И.П. Научные основы современного мониторинга окружающей среды - Изв АН СССР Сер геогр, 1975, № 3, с 13-25.

Исаченко А.Г. Экологические проблемы и эколого-географическое картографирование. Изв. ВГО. 1990. Т123. Вып.4.

Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 2003. 204 с.

Клёсов А.А., Ферментативный катализ. Ч. 1. / А.А. Клёсов, И.В. Березин - М.: Изд-во МГУ, 1980.

Кочуров Б.И. Экодиагностика и сбалансированное развитие. Смоленск, «Маджента», 2003.

Кочуров Б.И., Шишкина Д.Ю. «Геоэкологическое картографирование» М.: «Академия», 2009.

Красная книга Тверской области. Ред. А.С. Сорокин. - Тверь: ООО "Вече Твери", ООО "Издательство АНТЭК". - 2002 – 256 с.: ил.

Крылов А.Г. Жизненные формы лесных фитоценозов. Л.: Наука, 1984. 184 с.

Лапина Г.П., Лихуша П.С. Закономерности хода ферментативной реакции, катализируемой о-дифенолоксидазой льна при варьировании ионной силы

раствора // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2010. Вып. 20. № 32 С. 23-26.

Лапина Г.П. Элементы кинетики ферментативных реакций: Учеб. пособие. Тверь: Твер. гос. Ун-т, 2006. - 64 с.

Лапина Г.П., Гаевская В.В., Лихуша П.С. Пероксидаза печеночницы благородной (HEPATICA NOBILIS) // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2015. № 2. С. 30-35.

Ленинджер, Л. Основы биохимии / Л.Ленинджер. – М.: Мир, 1985. Т. 1 – 3.

Молчанов А.А., Смирнов В.В. Методика изучения прироста древесных растений. М.: Наука, 1967, 95 с.

Николаев А.Я. Биологическая химия. 3-е издание, Москва, 2007, 568с., стр. 61 - 99.

Радкевич В.А. Экология. Минск: Вышэйшая школа, 1998. 159 с.

Степановских А.С. Общая экология: Учебник для вузов. М.: ЮНИТИ, 2001. 510 с.

Строев Е.А. Биологическая химия: Учебник для фармац. ин-тов и фармац. фак. мед. ин-тов. – М.: Высшая школа, 1986. – 479 с.: ил.

Стурман В.И. Экологическое картографирование: Учебное пособие. — М.: Аспект Пресс, 2003. — 251 с.

Сукачев В.Н., Зонн С.В. Методические указания к изучению типов леса. М.: Изд-во АН СССР, 1961. С.1-104.

Уткин А.И. Изучение лесных биогеоценозов // Программа и методика биогеоценологических исследований. М.: Наука, 1974. С. 281-317.

Хазиев Ф.Х., Хабиров И.К., Агафарова Я.М. Экологический анализ биохимических процессов в пойменных и осушенных почвах // Почвоведение. 1983. № 5. С. 80-85.

Чакчир Б. А., Алексеева Г. М. Фотометрические методы анализа: Методические указания.— СПб.: Изд-во СПХФА, 2002.— 44 с.

Шугалей В.С., Кесслер Р.М. Ферментология. Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1986. 93с.

Clementi, F., Palade, G.E. Intestinal capillaries. Permeability to peroxidase and ferritin. J. Cell. Biol., 1969, vol.41, p. 33-38.

Nessel A., Mader M. Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer-Eigenschaften, I. Trennung, Reinigung, chemische und physikalische Daten. L. Pflanzenphysiol., 1977, vol, 82, 1 2 3, T p. 235-246

Strickland, E.H. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 151, 70–75.

Srivastava O.P., van Huystee R.B. Can. J. Bot., 1977, vol. 55, pp. 2630–2635.

V. Сосна обыкновенная

1. Биологические и экологические характеристики вида сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*) (Петров, 1978)

Научная классификация

Царство: Растения (*Plantae*)

Отдел: Хвойные (*Gymnospermae(Pinophyta)*)

Класс: Хвойные (*Coniferales (Pinopsida)*)

Порядок: Сосновые (*Pinales*)

Семейство: Сосновые (*Pinaceae*)

Род: Сосна (*Pinus L.*)

Вид: Сосна обыкновенная (*Pinus silvestris*) (лат. *Pinus sylvestris*) - одно из самых распространенных деревьев в нашей стране. Это дерево очень неприхотливо к почве. Сосну можно встретить на сухих песках и на моховых болотах, на голых меловых склонах и на гранитных скалах. Но зато в отношении света сосна очень требовательна. Она совершенно не выносит затенения. Это одна из наших самых светолюбивых древесных пород.

Длинные узкие хвоинки сосны располагаются па ветвях парами. После отмирания они так же остаются соединенными и опадают вместе. Массовое опадение сухой сосновой хвои происходит осенью. А незадолго до этого в кронах сосен бывает хорошо заметна своеобразная пестрота: часть хвои зеленая, а часть - желтая. Если присмотреться, нетрудно заметить, что зеленые хвоинки располагаются на побегах данного года и прошлогодних, а желтые - на более старых побегах, которым уже три года. В средней полосе страны хвоинки сосны живут обычно не более

двух - трех лет. На Крайнем Севере и в других районах с суровым климатом «век» хвоинок гораздо больше.

Каждую весну у сосны распускаются почки и появляются молодые побеги, как у лиственных деревьев. У основания некоторых, только что появившихся побегов можно заметить плотные светло - желтые грозди мужских шишечек. Эти шишечки невелики - каждая меньше косточки вишни. В них созревает пыльца, которая высыпается затем в виде желтого порошка и разносится ветром. Отдельная пылинка очень мала и чрезвычайно легка. Когда смотришь на нее в сильную лупу, она выглядит как маленький шарик с двумя мешковидными выростами по бокам. Эти мешочки заполнены воздухом. Сосна производит огромное количество пыльцы, но лишь ничтожный ее процент попадает на женские шишечки и производит опыление. Вся остальная масса пыльцы погибает. Женские шишечки сосны можно найти весной на концах молодых побегов. Они имеют вид крохотных зернышек размером немного больше булавочной головки и не очень заметны среди окружающих их хвоинок. Обычно на конце побега бывает только одна шишечка. После опыления шишечка - крупинка проходит долгий путь развития, прежде чем станет зрелой деревянистой шишкой. На это уходит почти два года. К осени первого года шишечка вырастает до размера горошины. Основной ее рост происходит на втором году. Она становится крупной, зеленой, а под кожей коричневатой. К зиме в ней полностью созревают семена.

Рассеивание семян происходит весной. Выпав из шишки и оказавшись в воздухе, семя, снабженное небольшим пленчатым крылышком, начинает очень быстро вращаться, как маленький пропеллер. Это имеет определенный биологический смысл. Крутящееся семя опускается сравнительно медленно, и ветер может отнести его достаточно далеко от материнского дерева. Семена сосны похожи по внешнему виду на семена ели. Но отличить их нетрудно, надо только посмотреть, каким образом прикрепляется семя к крылышку. У сосны семя зажато между двумя отростками крылышка, словно охвачено с двух боков щипчиками. У ели способ прикрепления совершенно другой - семя лежит в углублении крылышка, как слива в столовой ложке.

Необычно выглядят проростки сосны, когда они только что появились из семени. Это маленькие растеньица, у которых стебелек короче спички и не толще обыкновенной швейной иглы. На верхушке стебелька - пучок лучеобразно расходящихся во все стороны очень тонких иголок - семядолей. Их у сосны не одна и не две, как у цветковых растений, а гораздо больше - 4 - 7.

Проросток сосны имеет настолько своеобразный вид, что многие, увидев его, наверняка затруднятся сказать, какое это растение. Ствол ее покрыт верхней части тонкой оранжевой корой, придающей дереву

своеобразную привлекательность. Однако в нижней части кора толстая, и ствол имеет серо - коричневый оттенок. Кора большой толщины имеет для дерева важное значение: она предохраняет живые ткани ствола от ожога при сильном нагревании солнцем или при низовом пожаре в лесу (когда горит только сухая хвоя на поверхности почвы). Сосна очень чувствительна к ядовитым газам, которые выбрасывают трубы заводов и фабрик. В особенности вреден для нее сернистый газ. Наверно, многие замечали, какой жалкий, угнетенный вид имеют старые сосны в больших городах и поблизости от некоторых заводов. У таких деревьев много сухих отмерших веточек, а те, что остались в живых, покрыты короткой и редкой хвоей. Иногда живой хвои совсем мало. Деревья кажутся больными, погибающими. Сернистый газ, проникая внутрь хвоинок через устьица, вызывает отравление живых тканей. В результате хвоя почти не снабжает дерево органическими веществами.

Роль в природе и значение в жизни человека

Сосновые леса являются благоприятным местом обитания мелких промысловых зверей и птиц, которые здесь находят достаточный корм и надежную защиту в течение года, особенно в зимнее время они защищены от холодных ветров. Народнохозяйственное значение сосны огромно. Древесина сосны с красноватым ядром и желтовато – белой заболонью отличается высокими техническими качествами и прочностью. По сравнению с древесиной лиственницы у сосны она легкая и мягкая, в то же время достаточно плотная и прочная, легко обрабатывается. Широко применяется в жилищном строительстве, столярном и мебельном производстве, вагоностроении и авиационной промышленности.

Древесина сосны так же, как и других хвойных пород, является ценным сырьем для химической промышленности. В городах и селах можно видеть причудливые украшения из древесины сосны в деревянных строениях: двухэтажных коттеджах, особняках, уникальные предметы спального гарнитура, кухонной, а также другой домашней мебели.

Сосна обыкновенная долго служила и продолжает служить поставщиком живицы, из которой вырабатывают смоляные спирты и кислоты, эфиры и терпены, канифоль и скипидар, а также многие другие продукты. Канифоль широко применяется для проклейки бумаги и картона, приготовления лаков и эмалей, в мыловарении, при производстве линолеума, типографской краски, сургуча, синтетического каучука и резины. Она нужна и для музыкантов для натирания смычков. Скипидар используется при производстве лаков, красок, духов, технической камфары, которая необходима для производства пластмасс, кинофотопленки, искусственных тканей и взрывчатых веществ.

Применяется также как раздражающее и отвлекающее средство при ревматизме, невралгии, подагре; при катаре верхних дыхательных путей и болезнях легких, в качестве противомикробного средства. Сосну можно назвать янтарным деревом. Янтарь - одно из удивительных и красивейших созданий природы- своим происхождением обязан именно сосне. Этот продукт образуется за счет выделения живицы из хвойных пород. В настоящее время янтарь находит широкое применение не только в производстве различного рода украшений, но и в промышленности. Из янтаря изготавливают изоляторы, лаки, предохраняющие древесину от гниения, краски и даже некоторые физические приборы. Янтарь применяют при изготовлении медицинской посуды и инструментов, используемых при переливании крови. Кислота, получаемая из янтаря, идет на производство лечебных препаратов. Деготь- продукт сухой перегонки сосновой древесины - обладает дезинфицирующим раздражающим действием и применяется наружно при кожных заболеваниях и заживлении открытых ран.

В технике древесный уголь используется для поглощения жидкостей и газов, в медицине - в качестве противоядия при отравлении сильнодействующими веществами. Собранные до распускания ранней весной сосновые почки применяются в виде отвара, настоя и настойки как отхаркивающее, дезинфицирующее и мочегонное средство, а также для ингаляций при заболеваниях верхних дыхательных путей. Настой хвои применяют для профилактики и лечения цинги. В годы Великой Отечественной войны и первые послевоенные годы витаминный напиток из хвои сосны служил единственным доступным средством лечения от цинги и спас жизнь многим юным гражданам страны. Теперь же из хвои вырабатывают концентраты витаминов, кормовые продукты. Даже незначительное добавление витаминной муки из хвои сосны в рацион сельскохозяйственных животных увеличивает их вес, улучшает вкусовые и питательные качества мяса и молока. Экстракт хвои используется для лечебных ванн и изготовления парфюмерных изделий. В России сосновые леса превратились в живописные места отдыха граждан, В них без нарушения установившейся экологической обстановки строят санатории, Дома отдыха и турбазы. Воздух здесь всегда чистый, содержит вещества, убивающие микробы. В жаркую погоду скипидар способствует превращению части кислорода в озон. Озонированный воздух успокаивает деятельность нервной системы человека (Петров, 1978).

2. Действие загрязняющих веществ на растения

Поступление токсических неорганических соединений в листья условно можно разделить на три фазы (Илькун, 1978):

1. Сорбция кутикулярным слоем и клетками эпидермиса;

2. Диффузия через устьичные щели внутрь листа и растворение в воде, насыщающей оболочки клеток, выстилающих дыхательные полости;

3. Передвижение от мест поглощения к соседним тканям и накопление в клетках.

На скорость проникновения токсических ионов и молекул через покровные ткани оказывают влияние их размеры. Так, интенсивность поступления их в листья увеличивается при гидратации, что бывает в период осадков, туманов и росы. Поступление токсических веществ в листья через покровные ткани сокращается, хотя и не прекращается совсем в неблагоприятных погодных условиях (Гетко, 1989), например, при длительной летней засухе (Тарабрин, 1974).

Большинство токсикантов (соединения углерода, серы, азота) в низких концентрациях могут служить источником необходимых растению макро- и микроэлементов. И в этом случае клетка обладает механизмами активного транспорта ионов через плазмалемму. В общих чертах этот механизм действует согласно с клеточным метаболизмом до тех пор, пока ионы или другие вещества не нарушают внутриклеточных реакций (Гетко, 1989).

Поступающие в лист фитотоксиканты неравномерно распределяются в пределах листовой пластинки и всего растения. Большинство из них транспортируется по ксилеме на верхушку или края листовой пластинки. Проникшие в цитоплазму токсические соединения сосредотачиваются в основном в вакуолях (Соловьева, 2004).

Распространение и распределение атмосферных токсикантов, в тканях листа при закрытых устьицах, может быть представлено в следующей последовательности: поглощенные кутикулой газы диффундируют в нижерасположенные оболочки эпидермальных клеток, частично проникают в клетки, но в основном распространяются по свободному пространству к соседним клеткам и достигают проводящих сосудов (Илькун, 2002).

Если токсические газы проникают через устьица, то они насыщают оболочки клеток, выстилающих дыхательные полости и каналы, растворяются в воде, и одна их часть проникает в клетку, а другая вместе с током воды транспортируется по жилкам до мест потребления (Гетко, 1989).

Однако не все элементы распределяются в растении по указанному пути. Распространение и распределение токсических веществ разной химической природы в пределах листовой пластинки и всего растения контролируется не структурой проводящих тканей, а избирательным поглощением каждого из них в отдельности и зависит от концентрации токсического вещества, скорости его поступления в лист и передвижения

по сосудам (Косулина, 2003). При медленном поступлении, но быстром оттоке по ксилемным сосудам токсические соединения сосредотачиваются на верхушке и периферии листа, в результате чего появляются глубокие и необратимые нарушения. Так, по краям листа в условиях постоянного загрязнения воздуха газообразными токсикантами содержится в 10-50 раз больше фтора, окислов серы, азота, чем в серединной его части (Илькун, 1978).

Илькун Г.М. (1978) наблюдал, что вместе с транспортными метаболитами из сформированных листьев экспортируется часть накопленных токсических веществ. Накопление в молодых листьях высоких доз токсических веществ, поступающих из средневозрастных листьев, может вызвать полную их гибель и опадение. Аккумулирующиеся в побегах путем оттока из листьев и притока из корней токсические соединения передвигаются к меристематическим тканям в период их активного состояния и отрицательно влияют на рост побегов, листьев и формирование генеративных органов (Гутаюк, 2002).

Реакция на действие атмосферных газообразных токсикантов в большинстве случаев носит двухфазный характер:

- увеличивается активность функциональных приспособлений;
- происходит угнетение метаболизма.

Соотношение этих двух фаз в значительной мере определяет степень газоустойчивости растений (Тарабрин, 1974).

На деревьях в зонах высокой загазованности много недоразвитых деформированных листьев, уже в начале лета проявляется омертвление их тканей, начинающееся с краев, а затем распространяющееся к середине. Листья темнеют, засыхают и опадают, чем сокращается продолжительность жизни растений (Майснер, 1981).

В условиях промышленно-загрязненной среды древесные растения имеют более мелкие листья, большую толщину эпидермиса, меньшие размеры клеток ассимиляционной паренхимы и устьиц, большее количество устьиц на единицу площади листа. Усиление ксероморфности в строении листьев часто способствует повышению их газоустойчивости (Исаченко, 1938; Николаевский, 1969).

Под действием загрязняющих веществ, происходит подавление фотосинтеза, нарушение водообмена, многих биохимических процессов, снижение транспирации, общее угнетение роста и развития растений. Это приводит к изменению окраски листьев, некрозу, опадению листьев, изменению формы роста, ветвлению и т.д. (Хвастунов, 1999).

Накапливаясь в тканях листа сверх допустимого уровня, токсикант вызывает у растений различные нарушения в структурной организации и функциональной деятельности. Начальными признаками поражения являются снижение транспирации и фотосинтеза, ухудшение

поглощающих функций корня. Эти сдвиги вначале обратимы, но по мере накопления отравляющего вещества происходят резкие изменения ультраструктуры клеток (разбухание оболочки, нарушение структуры митохондрий и хлоропластов), а затем и ухудшение углеводного, белкового и фосфорного обменов (Майснер, 1981).

3. Характеристика приоритетных загрязнителей воздуха и их отрицательного воздействия на древесные растения

3.1. Диоксид серы

Среди серосодержащих техногенных эмиссий наиболее фитотоксична двуокись серы. Установлено, что SO_2 является сильнодействующим ассимиляционным ядом (Сергейчик, 1984). В тоже время SO_2 является местным ядом, убивающим только те участки мезофилла листа, в которые он проник, не затрагивая, существенно, жизнедеятельность соседних участков мезофилла. Растений, абсолютно устойчивых к сернистому газу, как и к другим вредным промышленным отходам, практически нет. Растения, у которых участки повреждений составляют до 20 % общей площади листьев, относят к слабоповреждаемым. У среднеповреждаемых видов участки повреждений составляют до 50 % и у сильноповреждаемых - свыше 50 %. Более восприимчивыми к сернистому ангидриду оказались липа сердцелистная (*Tilia cordata* L.), клен остролистный (*Acer platanoides* L.), рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.), черемуха обыкновенная (*Rodus racemosa* (Lam.) Gilib.), смородина черная (*Ribes nigrum* L.) и другие (Николаевский, 1979).

Поступление. Диоксид серы, прежде всего, воздействует на клетки, которые регулируют открывание устьиц. Степень их открывания в начальный период является основным параметром, определяющим интенсивность воздействия загрязнителя (Калверт, 1988). Даже при очень малых концентрациях диоксид серы способен оказывать стимулирующее действие, в результате которого устьица остаются постоянно открытыми. В тоже время при высоких концентрациях диоксида серы устьица закрываются. Кроме того, в случае высокой влажности устьица открываются, в случае низкой – закрываются (Илькун, 1978).

Попав в межклеточное пространство листа, загрязняющее вещество вступает в контакт с мембраной окружающей клетку. При нарушении целостности этой полупроницаемой мембраны нарушается баланс питательных веществ и процесс поступления ионов. Пройдя в клетку, диоксид серы взаимодействует с митохондриями и хлоропластами, в том числе и с их мембранами, что может привести к весьма серьезным последствиям (Соловьева, 2003).

Потребность. Сера необходима для нормального роста растений, и присутствие SO_2 может оказывать влияние и на усвояемость серы.

Растения потребляют серу в восстановленном состоянии (Горышина, 1991). В присутствии SO_2 основным продуктом становится сульфат; присутствует также цистеин, глутатион и, по меньшей мере, одно не идентифицированное вещество. Основными промежуточными соединениями при восстановлении сульфатов являются сульфиты (Алексеев, 1990).

Механизм токсического действия SO_2 детально обсуждается в ряде монографий (Илькун, 1978; Николаевский, 1979; Гудериан, 1979) и научных статей отечественных и зарубежных авторов. Сернистый ангидрид в воздухе постепенно окисляется до серного и растворяется в воде, образуя мельчайшие капельки серной кислоты, повреждающей листья (Романова, 2005).

Механизм фототоксического действия заключается в неспецифическом нарушении деятельности многих ферментов вследствие подкисления цитоплазмы и нарушения ионного режима. Наблюдаются нарушения метаболизма органических соединений, фотосинтетических структур, происходит накопление балластных токсических продуктов, транспортных путей миграции энергии от хлоропластов к центрам их использования, появляются автокаталитические цепные реакции свободнорадикального и фотодинамического окисления (Николаевский, 1969, 1979). Токсичность сернистого газа значительно увеличивается в присутствии других загрязнителей - окислов азота и озона.

Различают 2 группы повреждений, связанных с действием SO_2 :

1. Видимые, выражающиеся в деформации, пятнистости и некрозах ассимиляционных органов;
2. Скрытые, проявляющиеся в снижении продуктивности за счет ингибирования фотосинтеза, изменении метаболизма, увеличении восприимчивости к болезням и вредителям, ускорении старения растений (Алексеев, 1990).

Морфологические повреждения. Это соединение адсорбируется на поверхности растения, в основном на его листьях, и оказывает на него вредное влияние. Обычно поражаются края листовой поверхности, а центральные зоны листа, примыкающие к осевой и главным боковым жилкам, остаются здоровыми (Кулагин, 1974). Появляются пятна на участках между жилками и краях листа. Потом эти участки приобретают желтый и красно-оранжевый цвет и отмирают. При длительном воздействии сернистого газа подавляется рост растений, в некоторых случаях отмирают верхушки побегов.

Физиологические повреждения. Сернистый ангидрид и другие кислые газы, проникая внутрь листа, нарушают процесс фотосинтеза,

связывая, в частности, каталитически активное железо. Процессы окисления протекают с участием свободных радикалов, образованных из двуокиси серы в результате химических реакций (Алексеев, 1990). Они окисляют ненасыщенные жирные кислоты мембран, тем самым, изменяя их проницаемость, что в дальнейшем отрицательно влияет на процессы дыхания, фотосинтеза.

Фотосинтетический аппарат клетки проявляет высокую чувствительность к SO_2 , которая может нарушать световую и темновую стадии фотосинтеза, воздействуя на состояние хлорофилла, активность ферментов, электронтранспортную цепь или ламеллярную структуру гран. SO_2 уменьшает скорость выделения кислорода, но не влияет на скорость поглощения кислорода в процессе дыхания. По мнению японских исследователей, SO_2 инактивирует первичный донор электронов или сам реакционный центр цепи переноса электронов. $1 \cdot 10^{-6}$ SO_2 в течение 6 часов обработки листьев существенно снижает ациклическое фосфорилирование (Сергейчик, 1984). Аккумуляция в тканях избыточного количества серы приводит к нарушению работы регуляторных механизмов и патологическим явлениям, вследствие чего наблюдается депрессия роста клеток, тканей и органов, нарушаются синтетические и обменные процессы. Причиной этому является подавление синтеза АТФ и изменение активности ферментных систем (Илькун, 1978).

В условиях выключенного фотосинтеза, но продолжающегося поступления солнечной энергии хлорофилл начинает, как флуоресцирующее вещество проявлять фотодинамическое действие, которое сводится к фотоокислениям. Фотоокислению подвергаются разнообразные вещества – белки, фосфатиды, аминокислоты и др. Поэтому под влиянием сернистого ангидрида происходит их разрушение, ведущее к отмиранию клеток и сопровождаемое снижением окисляемости клеточного содержимого. С повышением интенсивности освещения токсичность сернистого ангидрида возрастает, и наоборот (Кулагин, 1974).

Анатомические повреждения. При частых или постоянных воздействиях низких концентраций газов в тканях растений постепенно накапливаются токсичные соединения серы (Кулагин, 1974). Нинова Д. (1970) под влиянием SO_2 обнаружила уменьшение объема межклетников в губчатой ткани, усиленное развитие кутикулы, удлинение клеток палисадной ткани. Уменьшается объем клеток ассимиляционной паренхимы наряду с уменьшением толщины столбчатой, губчатой ткани и всего листа[5]

Биохимия. Сернистый газ снижает содержание в растениях дисахаров и способствует увеличению количества крахмала. Причиной этого является активизация и дезактивация различных ферментов,

стимуляция и подавление синтеза специфических ДНК и РНК [8]. Согласно Мальхотра (1977), биохимическим порогом фитотоксического действия SO_2 является концентрация $0,05 \cdot 10^{-6}$. Однако существует мнение, что пороговой является величина, в 5 раз меньшая ($0,01 \cdot 10^{-6}$), при которой обнаруживаются изменения содержания галактолипидов мембран тилакоидов (Сергейчик, 1984). Диоксид серы ингибирует различные биохимические реакции. Сульфиты, обладающие слабокислотными свойствами, дезактивируют некоторые ферменты, блокируя активные центры, препятствуя протеканию основной химической реакции; это явление известно как конкурентное ингибирование (Илькун, 1978). Диоксид серы является конкурентным ингибитором дифосфаткарбоксилазы, препятствующим фиксации CO_2 в процессе фотосинтеза. Обладая свойствами свободных радикалов, SO_2 нарушает протонный градиент, с которым связано образование АТФ (Алексеев, 1990).

Загрязнение воздуха SO_2 вызывает нарушение азотного обмена древесных растений, глубина и направленность которого зависят от возраста и биологических особенностей вида. Появление видимых симптомов повреждения коррелирует с накоплением в листьях значительного количества путресцина, глутамина, аммиака. Малые дозы SO_2 увеличивают, а высокие уменьшают содержание общего и белкового азота. Для устойчивых видов отмечается рост содержания водорастворимых белков альбуминов – белков нерастворимого остатка. У неустойчивых (относится рябина) – превращения белков направлены в сторону уменьшения содержания альбуминов, глобулинов и увеличения высокомолекулярных белков (Шацкая, 1983). Повышение концентрации SO_2 сопровождается снижением общего количества фосфатов, которые необходимы для роста и развития растений. Одновременно с увеличением или уменьшением общего фосфора синхронно и в том же направлении изменяется содержание неорганического фосфора. При скрытых поражениях листьев количество кислотонерастворимых фосфорных соединений уменьшается (Сергейчик, 1984). При наличии видимых повреждений их количество вначале быстро возрастает, а с повышением степени повреждения листьев – превышает контрольные величины незначительно (Илькун, 1978). Загрязнение воздуха SO_2 также нарушает углеводный обмен. При скрытых и начальных повреждениях листьев уменьшается содержание дисахаров, но значительно увеличивается содержание крахмала. Более сильные повреждения – ослабляют гидролиз и синтез крахмала с одновременным уменьшением содержания моно- и дисахаров (Алексеев, 1990). В этом случае не только изменяется скорость взаимопревращения углеводов, но и происходит подавление фотосинтетической деятельности листьев (Илькун, 1982).

Хотя точный механизм действия SO_2 на молекулярном уровне неизвестен, можно предположить, что основную роль играют присутствие избыточного количества окисленных форм серы, нарушение баланса с восстановленными формами и воздействие на жизненно важные ферменты.

Адаптации. Под влиянием SO_2 у растений усиливаются признаки ксероморфности: уменьшается площадь листовых пластинок, увеличивается степень жилкования и количество устьиц, размеры клеток устьичного аппарата уменьшаются (Сергейчик, 1984). Добровольский, Щербак (1976) установили, что в процессе приспособления к условиям загрязнения у растений наблюдается мелкоклетчатость, утолщение клеточных оболочек.

Последствия от диоксида серы: обожженные листья после газовой атаки не опадают сразу же, а продолжают оставаться в кроне. Однако продолжительность их жизни заметно сокращается, и они опадают на 4-6 недель раньше по сравнению со здоровыми листьями Добровольский, Щербак (1976). При остром поражении (более 2 мг/м³) уже через 1-2 часа происходит побурение и гибель листьев, чаще отдельных их участков в виде пятнышек с четко очерченной границей между живыми и отмершими клетками и тканями. При слабом поражении (менее 0,5 мг/м³) и длительном действии диоксида серы листья обесцвечиваются (Николаевский, 1978).

Влияние погодных условий. Установлено, что эффект влияния SO_2 на растения зависит от особенностей сопутствующих метеорологических факторов: повторяемости, продолжительности и мощности температурных инверсий, скорости ветра, наличия туманов. С повышением температуры и относительной влажности воздуха увеличивается опасность повреждения растений. Наибольшую чувствительность к SO_2 листья обнаруживают в диапазоне 18-40°C, а наименьшую – при температуре, близкой к 40°C. В пределах 4 – 18°C изменения в газочувствительности незначительны. (Крокер, 1950). Цан (1963) установил, что устойчивость кустов смородины к SO_2 значительно возрастает по мере снижения влажности воздуха. Так, 8-часовое воздействие SO_2 в концентрации $0,8 \cdot 10^{-6}$ при относительной влажности 87% сопровождалось появлением сильных некрозов ассимиляционных органов. Степень повреждающего действия SO_2 в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ при 42% относительной влажности воздуха уменьшалась вдвое. При понижении влажности воздуха до 29% повреждающий эффект токсиканта отсутствовал. Эти данные хорошо согласуются с выводами Томаса и Хендрикса о снижении газочувствительности растений в 10 раз в случае падения влажности воздуха от 100 до 0%. Различия в

газочувствительности растений в зависимости от условий влажности отражают неодинаковое накопление загрязнителя в органах ассимиляции. Оно увеличивается по мере повышения тургорного давления и более полного открывания устьиц (Сергейчик, 1984). Инверсии и слабые ветры способствуют сильному возрастанию фитотоксичности SO_2 при скоплении в районах с пониженным рельефом местности. Фитотоксичность SO_2 увеличивается в условиях засухи (Николаевский, 1978) и крайне холодной зимы.

Влияние времени суток. Газочувствительность растений изменяется в течение суток. Она наиболее высока в предполуденное время, спустя 4-5 часа, после рассвета. Ранним утром, вечером и ночью газочувствительность падает (Романова, 2005). В экспериментах по определению количества поглощаемой SO_2 в темновой и световой периоды было показано, что ночью в листьях накапливается в 3 раза меньше серы, чем днем (Майснер, 1981). Имеются данные о резком ослаблении фитотоксичности SO_2 в затенении. Под пологом дубово-липового леса по сравнению с его опушкой газовые ожоги исчезают не только у световых, более ксероморфных, но и у теневых листьев (Кулагин, 1974).

3.2. Оксид углерода

Оксид углерода малотоксична для растений, но считается, что зеленые насаждения не способны очищать от нее атмосферу (Николайкин, 2003). Повышение концентрации CO_2 в атмосфере, даже без учета глобального потепления, способно привести к значительному изменению структуры и функционирования экосистем, что скажется неблагоприятно на растениях (Алексеев, 1990). Удвоение концентрации CO_2 в атмосфере влияет на древесные растения за счет:

- снижения обмена веществ, через устьичный аппарат;
- усиления фотосинтеза.

В большинстве случаев это приводит к усилению прироста деревьев и эффективности водопоглощения.

Морфология. Длительное выдерживание растений при высокой концентрации CO_2 сопровождается увеличением площади и толщины листа, стимуляцией роста побегов второго порядка, усилением ветвления или кущения (Николаевский, 1979), также увеличивается длина стеблей и корней, количество цветков, плодов и семян, возрастает доля корней и запасующих органов. Наблюдается увеличение продолжительности жизни, изменение времени смены фаз развития, увеличивается число клеток мезофилла и хлоропластов (Романова, 2005).

Биохимия. Исходя из физиологических особенностей, пользу от повышения CO_2 могут извлечь C3-растения, к которым относятся

практически все деревья. У СЗ-растений на первой стадии фиксации молекула CO_2 связывается с рибулозодифосфатом, содержащим 5-углеродный сахар. В результате реакции, происходящей под действием фермента рибулозодифосфаткарбоксилазы, образуется короткоживущее нестабильное соединение, включающее 6-углеродный сахар. Оно распадается на два производных, которые содержат по три атома углерода – отсюда и название «СЗ-растения». С диоксидом углерода за активный центр рибулозодифосфаткарбоксилазы конкурирует кислород атмосферного воздуха. Если побеждает кислород, растение теряет энергию, так как во время утилизации кислорода не происходит фиксации CO_2 (Калверт, 1988). По мере увеличения концентрации CO_2 вероятность связаться с активным центром фермента повышается. Однако у этих растений, в условиях возросшей концентрации CO_2 сначала происходит усиление фотосинтеза, но после временной активации наступает его торможение. Транспортная система растения полигенна и зависит от многих факторов (энергетических, гормональных и др.), поэтому не может быстро перестроиться. Поэтому при длительном воздействии на растение CO_2 , в условиях повышенной концентрации, фотосинтез снижается из-за избыточного накопления крахмала в хлоропластах (Мокроносов, 1992).

Физиология. Наиболее часто наблюдаемая реакция растений на повышение концентрации CO_2 - уменьшение устьичной щели и, как следствие, уменьшение проводимости водяного пара. Экспериментальные данные об изменениях числа устьиц на единице площади листьев при повышении концентрации CO_2 в современных условиях еще крайне ограничены и противоречивы. В то же время, установлено, что в предыдущие геологические эпохи число устьиц на единице поверхности листа при низком содержании CO_2 в атмосфере увеличивалось, а при высоком – снижалось (Романова, 2005).

При изменении концентрации CO_2 в широких пределах, в растениях, представляющих наиболее северные леса умеренной полосы, усиливается фотосинтез.

Изменение концентрации CO_2 должно быть строго сбалансировано с потреблением азота, фосфора, других питательных веществ, света, воды, без нарушения экологического равновесия. Нарушение баланса, безусловно, скажется на устойчивости растений и их продуктивности (Соловьева, 2003).

3.3. Оксиды азота

Среди них наиболее распространенными загрязнителями воздуха являются оксид азота $\text{NO}(\text{II})$ и диоксид азота NO_2 (IV).

Оксид азота NO – бесцветный тяжелый газ, кислородом воздуха окисляется до диоксида азота.

Диоксид азота NO₂ - газ коричнево-бурого цвета (плотностью 1,49 кг/м³), который, реагируя с влагой воздуха, превращается в азотную и азотистую кислоты. Время жизни NO₂ в атмосфере около 3 суток. NO₂ обуславливает фотохимическое загрязнение атмосферы, поскольку реагирует с другими веществами: с диоксидом серы SO₂, кислородом, углеводородами. Диоксид азота в пять раз токсичнее оксида азота. В атмосфере оксид и диоксид азота находятся в динамическом равновесии, превращаясь друг в друга в результате фотохимических реакций, в которых участвуют в качестве катализатора. Их соотношение в воздухе зависит от интенсивности солнечного излучения, концентрации окислителей и других факторов (Косулина, 1993).

Оксиды азота вызывают сходные с диоксидом серы физико-биохимические повреждения у древесных пород (Хвастунов, 1999).

Морфология. В городском воздухе, в зонах с повышенным содержанием окислов азота, наблюдается «позеленение» стволов и нижних ветвей деревьев, что способствует интенсивному разрастанию на коре деревьев мелких водорослей зеленого цвета. Они получают необходимое им обильное азотное питание непосредственно из воздуха. На листьях появляются темно-коричневые или темные почки, расположенные между жилками и по краю листа (Косулина, 1993). В концентрациях более 2 мг/м³ вызывают глубокие повреждения листьев. Отличительной особенностью их являются буровато-черные участки, чаще всего у вершины и у периферии листовой пластинки (Хвастунов, 1999).

Физиология. Двуокись азота ингибирует транспирацию в освещенных листьях, вызывая частичное закрывание устьиц (Илькун, 1978). Действие газообразных NO₂ и NO в концентрациях не приводящих к появлению видимых повреждений, вызывает понижение интенсивности фотосинтеза. Комбинированное действие этих газов аддитивно, однако эффект воздействия NO проявляется быстрее, чем эффект действия NO₂. Ингибирование фотосинтеза под действием NOx может быть вызвано конкуренцией за НАДФН, происходящих в хлоропластах процессов восстановления нитрита и ассимиляцией CO₂. Закисление, вызванное NO₂ влияет на транспорт электронов и фотофосфорилирование (Трахтенберг, 1994). Под действием NO₂ происходит разбухание мембран хлоропластов (Трешоу, 1988).

По сообщению Г. Хаута (1975) NO₂ в 1,5-5 раз менее токсичен для растений по сравнению с SO₂. Хаут считает, что безвредная концентрация NO₂ составляет 0,35 мг/м³, при длительном действии на растения и 0,8

мг/м³ при газации 30 мин. Фитотоксичность окислов азота повышается при одновременном проникновении их в листья вместе с сернистым газом и озоном (Илькун, 1978).

3.4. Аммиак

Аммиак для растений менее токсичен, чем сернистый газ, однако при длительном воздействии даже низких его концентраций обнаруживаются заметные признаки повреждения растений (Соловьева, 2003).

Морфология. Повышенные концентрации аммиака вызывают появление темных, почти черных, пятен некрозов на обеих поверхностях листа, опадание листьев (Соловьева, 2003).

Биохимические и структурные изменения мембран могут происходить под действием образующегося из диоксида азота NH₃, не включенного в аминосоединения. NH₃ ингибирует фотосинтез путем разобщения электронного транспорта и приводит к структурным нарушениям (Трешоу, 1988).

4. Пероксидаза - как компонент антиоксидантной системы живых организмов.

Жизнеспособность организмов поддерживается за счет высокой активности антиоксидантной системы, в составе которой низко- и высокомолекулярные антиоксиданты. Роль антиоксидантов сводится к тому, что в низких концентрациях они способны инициировать свободнорадикальные процессы, проявляя при этом прооксидантные свойства. Тогда как при избытке они подавляют образование свободных радикалов в живых организмах, проявляя антиоксидантные свойства. В образовании свободных радикалов принимает участие кислород, используемый в живых системах преимущественно в процессах окислительного фосфорилирования. Основную роль в образовании активных форм кислорода в живых организмах выполняют гемсодержащие белки, в составе которых железо в комплексе с протопорфирином IX. Эти белки выполняют самую разнообразную функцию в биогенных системах. Одни из них способны переносить кислород (гемоглобин и миоглобин), другие катализируют окислительно-восстановительные реакции (каталаза, пероксидаза, цитохром с пероксидаза и др.) (Рогожин, 2004).

4.1. Особенности строения молекулы пероксидазы.

Пероксидаза- двухкомпонентный фермент, представляющий собой сочетание активной группы, вступающей в химическое взаимодействие с субстратами, и коллоидного белкового «носителя», усиливающего каталитическое действие этой группы. Это глобулярный белок диаметром

50 Å, который содержит около 43% α-спиральных участков в составе белковой части молекулы. По номенклатуре ферментов, принятой на Международном биохимическом съезде в 1979 г., пероксидаза-фермент, действующий на перекись водорода в качестве акцептора. Изученные до настоящего времени пероксидазы состоят из неокрашенного гликопротеина и соединенного с ним коричнево-красного феррипорфирина. Геминная часть молекулы (гемм, гемин)-железопорфирин IX представлен на рис. 1.5.1.1. Выполняя роль активного центра, он участвует в разложении или активации перекиси водорода, в результате чего возникают радикалы соответствующих субстратов. Полагают, что все известные пероксидазы и их изоформы содержат этот гем, поскольку они ингибируются азидом и цианидом.

Феррипротопорфирин IX входит в активный центр, составляя порфириновое кольцо гемма, являющегося высокоароматичным и гидрофобным соединением. Именно гидрофобное взаимодействие порфиринового макроцикла с белком формирует третичную структуру нативной пероксидазы. Известно, что протопорфирин оказывает важное стабилизирующее влияние на белковую глобулу гемсодержащих ферментов. Так, комплексообразование апопероксидазы хрена с гемом резко повышает устойчивость белка к действию ультрафиолета и тепла. Удаление протетической группы фермента ведет к потере пероксидазной активности, но не сказывается на ее оксидантной функции (Андреева, 1988).

4.2. Механизмы действия пероксидазы

Пероксидаза способна катализировать реакции оксидантного, пероксидазного и оксигеназного окисления субстратов (рис. 1.5.2.1.).



Рис.4.2.1. Каталитические свойства пероксидазы (Рогожин, 2004)

Не обладая специфичностью в реакциях индивидуального пероксидазного окисления, фермент способен приобретать избирательность в реакциях совместного окисления субстратов.

Наличие у фермента двух различных функций (оксидазной и пероксидазной) позволяет предположить, что в каталитическом действии фермента могут принимать участие два независимых активных центра пероксидазы, пространственно разделенных, хотя и близко расположенных друг от друга на молекуле фермента. Такая полифункциональность пероксидазы модулируется ионами металлов и состоянием микросреды вблизи молекулы. При этом идентификация пероксидазного и оксидазного участков фермента затруднена из-за недостаточности количественных данных о деталях структуры пероксидазы и ее молекулярной неоднородности.

Широкое распространение пероксидазы в растительных и животных тканях позволяет говорить, что этот фермент выполняет многогранную работу в биогенных системах. Поэтому исследование структуры и механизма действия пероксидазы представляет не только теоретический интерес для понимания физиологической роли и принципов функционирования фермента, но и имеет важное практическое значение, поскольку пероксидаза широко используется в аналитических исследованиях (Рогожин, 2004).

4.3. Роль пероксидазы в растительном организме

Пероксидаза катализирует большинство реакций, протекающих во всех типах тканей. Для этого фермента отмечают видовую, органогенную, тканевую и внутриклеточную специфичность распределения изопероксидазы. Присутствие фермента в хлоропластах указывает на его участие в окислительно-восстановительных реакциях в процессе фотосинтеза, а обнаружение пероксидазы в митохондриях - на участие в энергетическом обмене клетки. Значительная пероксидазная активность определена в очищенных препаратах рибосом. Имеются данные об участии пероксидазы в окислительном декарбоксилировании аминокислот. На основании цитохимических исследований пероксидазная активность была обнаружена в цитоплазме, клеточной стенке, хромосомах и ядрышек. Пероксидаза является индуцибельным ферментом, индукторами которого могут быть разнообразные физические, химические и биологические факторы, в том числе особого внимания заслуживают фитогормоны, как регуляторы многих физиологических процессов. В присутствии пероксидазы регулируется созревание и старение тканей, а также синтез лигнина, входящего в состав клеточных стенок. Пероксидаза - функционально очень лабильный фермент, способный реагировать на большинство нарушений гомеостаза. При этом

происходят изменения как в наборе молекулярных форм фермента, так и в проявлении их активности. Используя пероксидазные маркеры, удается более полно характеризовать защитные механизмы растений и найти подходы для диагностики устойчивости к вирусам разных сортов сельскохозяйственных культур. Используют пероксидазы в аналитических целях (напр., для определения микроколичеств H_2O_2 , ароматических аминов, загрязнений в окружающей среде), а также в иммуноферментном анализе. Данные по пероксидазной активности учитывают при селекции растений (чем выше эта активность, тем устойчивее к инфекции растения). Перспективно применение пероксидаз для селективного окисления органических соединений, а также для глубокой очистки сточных вод от ароматических соединений (Андреева, 1988).



Рис. 4.3.1. Функциональная роль пероксидазы в растительных и животных тканях (Рогожин, 2004)

Основная функция растительных пероксидаз прежде всего защитная. У хвойных пород выявлены сезонные различия в физиологических реакциях на урбанизированную среду: зимой в большей степени активируется пероксидаза, снижается содержание зеленых и желтых пигментов (летом повышается), в меньшей степени снижается содержание аскорбата, уменьшается проницаемость клеточных мембран, что можно рассматривать как защитно-приспособительный механизм, направленный на выживание растений в экстремальных условиях (Роговина, 1996).

5. Экспериментальные доказательства использования фермента пероксидазы хвой сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) в качестве тестового объекта для оценки экологического состояния окружающей среды

5.1. Выделение пероксидазы хвои сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*)

В соответствии с методикой, предложенной Филиповичем Ю.Б., пероксидаза, выделенная из образцов хвои сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*), собранных на разных расстояниях от автомагистрали Москва-Санкт-Петербург (5, 10, 50,100,500,1000 м) в Вышневолоцком районе, была обнаружена в надосадочной жидкости. Для дальнейших исследований определяли концентрацию пероксидазы с помощью калибровочной кривой.

5. 2. Определение количества белка по методу биуретовой реакции в хвое сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*)

Полученные экспериментальные данные по содержанию пероксидазы в хвое сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*) даны в табл. 5.2.1. и на рис. 5.2.1.

Таблица 5. 2.1.

Содержание пероксидазы в хвое сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*) на разных расстояниях от автомагистрали

Номер образца в зависимости от удаленности от автомагистрали	D, опт.ед.	C, мг\мл
1 (5м)	0,105	2,2
2 (10 м)	0,089	1,7
3 (50 м)	0,086	1,3
4(100м)	0,1	2
5 (500 м)	0,104	2,1
6 (1000 м)	0,081	1

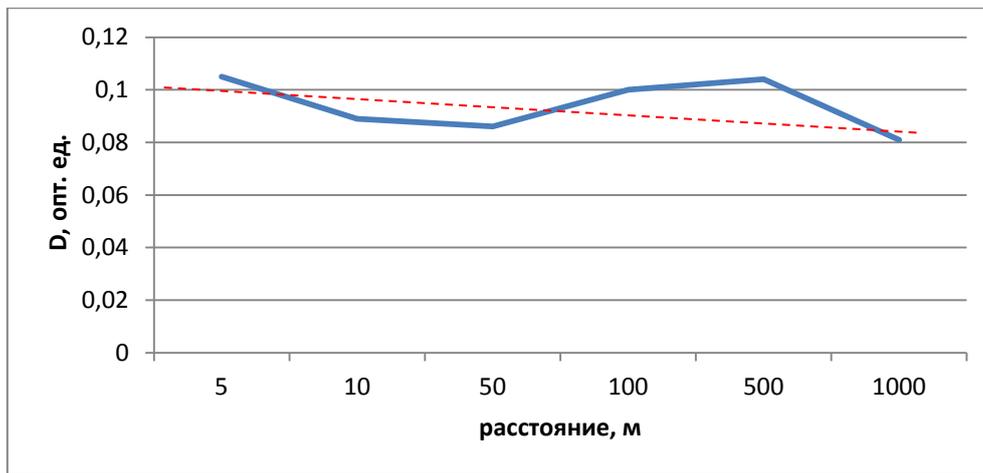


Рис. 5.2.1. Значение концентрации белка в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*). Образцы хвои собраны на разных расстояниях от автомагистрали

По мере удаления от автомагистрали на расстояния до 1000м наблюдается тенденция к снижению (пунктирная прямая) концентрации пероксидазы в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*).

5. 3. Определение ферментативных параметров по методу Бояркина

В связи с тем, что в работе достоверно выявлено снижение содержания пероксидазы в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), представляет интерес выяснить, как влияет один из компонентов выхлопных газов (HNO_3 разных концентраций) на активность фермента. Для решения этой задачи выполнены следующие программы для модельной системы, включающей разные концентрации азотной кислоты:

1. Построены кривые D- τ ;
2. Обработаны начальные участки кривых D- τ ;
3. Построены кривые в координатах $1/V_0 - 1/[C_s]$. В качестве субстрата были взяты H_2O_2 разных (M) концентраций (0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05).

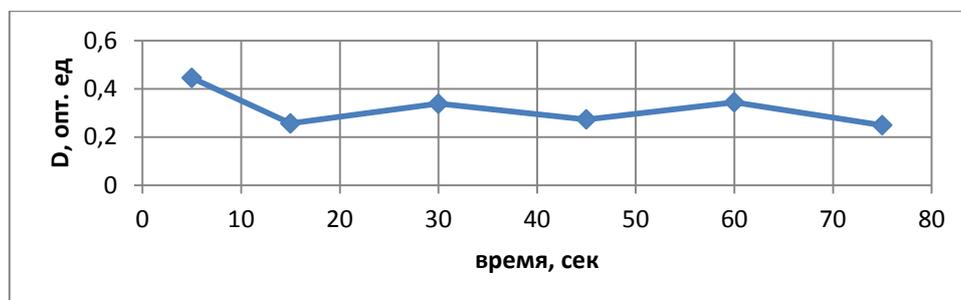


Рис. 5. 3.1. Экспериментальная кривая D- τ (концентрация H_2O_2 0,01 M)

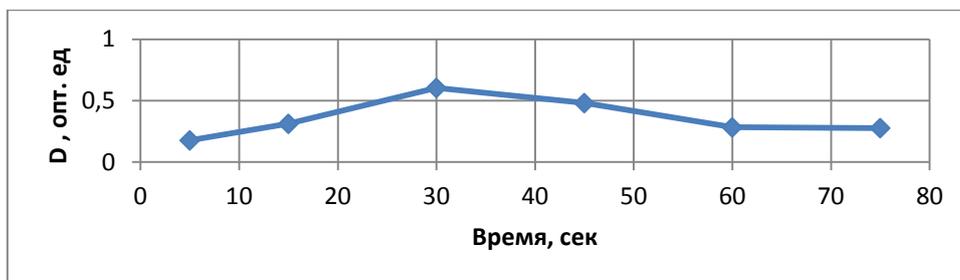


Рис. 5.3.2. Экспериментальная кривая D-τ (концентрация H₂O₂ 0,02 М)

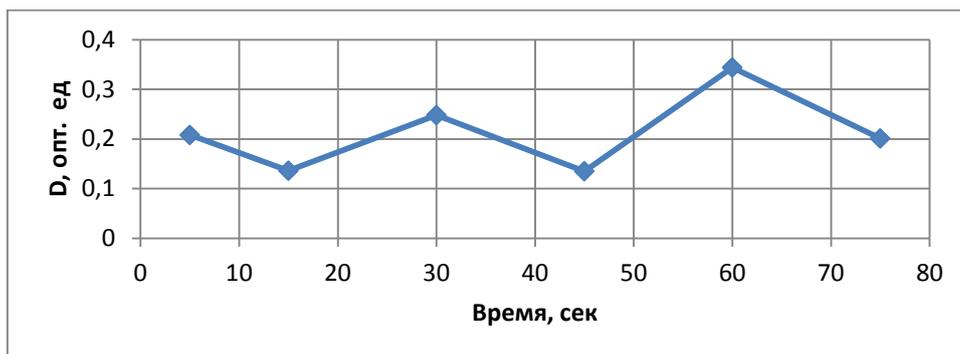


Рис. 5.3.3. Экспериментальная кривая D-τ (концентрация H₂O₂ 0,03М)

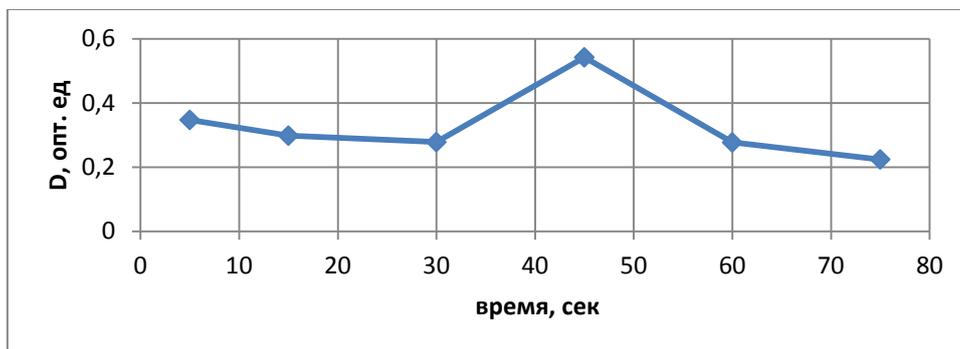


Рис. 5.3.4. Экспериментальная кривая D-τ (концентрация H₂O₂ 0,04М)

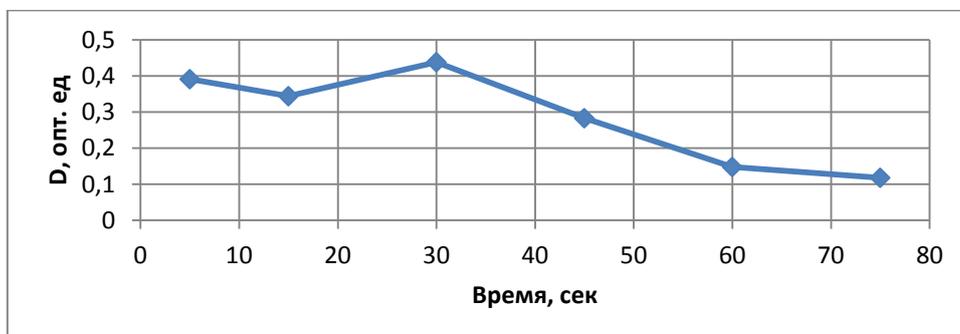


Рис. 5.3.5. Экспериментальная кривая D-τ (концентрация H₂O₂ 0,05М)

Обработка начальных участков кинетических зависимостей D-т (рис. 5.3.1. - 5.3.5.) позволила рассчитать значения ферментативных параметров ПО, которые приведены в табл. 5.3.1. В качестве контроля был взят коммерческий препарат пероксидазы хрена. В качестве анализируемой системы взята пероксидаза, выделенная из хвои сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*), с различными по количеству добавками азотной кислоты.

Таблица 5.3.1. Ферментативные параметры пероксидазы хвои сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*) в модельных системах II -IV

Системы	Название систем	Км, моль\л	К кат *10 ⁻⁵ , с ⁻¹	Vmax·10 ⁻⁵ , отн. ед
I	ПО контроль	0,035	33	0,165
II	ПО сосны	0,02	0,22	11
III	ПО сосны +HNO ₃ (конц)	0,606	1282	6,41
IV	ПО сосны+ HNO ₃ (разб)	0,909	3252	16,26

Видно, что взаимодействие ПО с HNO₃ в значительной степени влияет на соединение E с S, уменьшая этот параметр(Км) в 2- 26 раз. В то же время ослабление взаимодействия ПО с субстратом усиливает в 10²-10³ раз катализ (Ккат, Vmax). Это - классический пример конкурентной активации ПО.

Получены экспериментальные доказательства, что пероксидаза сосны обыкновенной(*Pinus sylvestris*) чувствительна в отношении одного из изученных в работе компонентов выхлопных газов - HNO₃. Этот установленный в работе факт позволяет утверждать, что пероксидаза хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) может служить биоиндикатором по отношению этого компонента(HNO₃), содержащегося не только в выхлопных газах, но и в любых других субстанциях. Кроме того, полученные собственные данные по пероксидазе хвои делают возможным сформировать молекулярный механизм влияния HNO₃ разных концентраций на ферментативное поведение этого биокатализатора.

5.4. Выделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

Представляло особый интерес выяснить аминокислотный состав хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*). Для этого выделяли смесь свободных аминокислот из хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) и разделяли ее методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для исследования взяты 6 образцов, взятых на разных расстояниях от автомагистрали.

Положение зоны вещества на хроматограмме характеризуется величиной R_f , которая равна отношению расстояния от стартовой линии до центра зоны вещества к расстоянию от стартовой линии до линии фронта. Значение R_f – величина постоянная для данного соединения в данной системе и зависит от ряда условий: способа элюирования, качества и активности сорбента, толщины слоя, качества растворителей, количества нанесенного вещества, длины пробега растворителей, положения стартовой линии и почти не зависит от температуры. По этой величине проводят идентификацию компонентов в смеси.

$$R_f = \frac{a}{b},$$

где a - расстояние от центра пятна пробы до стартовой линии, мм; b - расстояние от фронта растворителя до стартовой линии, мм (Гиндуллина, 2012).

R_f в данной работе получили следующие данные, представленные в табл.5.4.1.

Таблица 5.4.1.

Экспериментальные данные по числу и типу свободных аминокислот, обнаруженных методом ТСХ в образцах хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), собранных на разных расстояниях от автомагистрали

Удаленность биообъектов от автомагистрали, м	Число свободных аминокислот	Наименование свободных аминокислот	Значение R_f
5 (образец 1)	3(см. хроматограммы в Приложении А))	Пролин	3,76
		Аспаргин	4,57
		Аргинин	6,40
10 (образец 2)	1(см. хроматограммы в Приложении Б))	Пролин	4,13
50(образец 3)	6 (см. хроматограммы в Приложении В))	Фенилаланин-	1,61
		Лизин	3,62
		Глицин	4,83
		Лейцин	1,75
		Валин Триптофан	2,32

			1,41
100(образец 4)	2 (см. хроматограммы в Приложении Г))	Пролин Аспарагин	4,07 3,78
500(образец 5)	7 (см. хроматограммы в Приложении Д))	Пролин Аспарагин Цистеин Серин Аргинин Валин Глутамин	5,50 6,60 3,16 5,80 8,25 4,12 3,66
1000(образец 6)	3 (см. хроматограммы в Приложении Е))	Пролин Аспарагин Цистеин	4,07 5,18 3,84

Хроматограммы образцов №1-6 приведены в приложении.

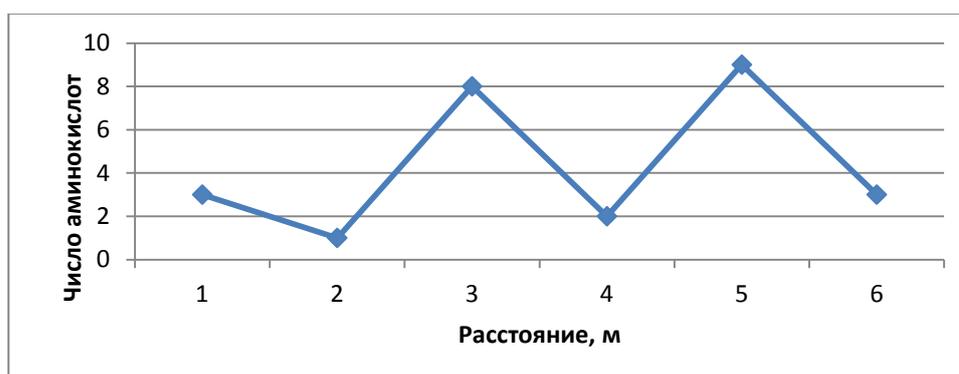


Рис. 5.4.1. Число свободных аминокислот в образцах хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), собранных на разных расстояниях от автомагистрали.

Видна тенденция к увеличению числа свободных аминокислот, что можно связать с улучшением экологической ситуации по мере удаления от автомагистрали.

Следует отметить, что есть сведения о том, что в растениях в условиях различных стрессовых воздействий значительно увеличивается содержание аминокислоты пролина, которая сочетает в себе защитные функции со способностью интенсивно накапливаться в вегетативных органах в неблагоприятных условиях среды. Причем наиболее устойчивые растительные формы в условиях стресса отличаются повышенным содержанием аминокислоты (Кузнецов, 1999).

5.5. Заключение

Одним из наиболее жестких в экологическом отношении техногенных факторов, охватывающим практически все компоненты экосистемы, является поступление автомобильных выбросов в атмосферный воздух. Проведенные биохимические исследования по оценке состояния хвойных позволили установить, что воздействие поллютантов вызвало изменения процессов метаболизма, которые были выражены в увеличении активности окислительного фермента - пероксидазы, повышенном уровне накопления свободного пролина и пластидных пигментов в хвое разного возраста практически в течение всего периода вегетации.

Известно, что при слабом воздействии токсичных веществ и при отсутствии видимых симптомов повреждения у растений происходит активация некоторых сторон метаболизма (Дурмишидзе, 1988; Сергейчик, 1988; Массель, 1981). Наблюдаемые нами изменения обменных процессов можно рассматривать как адапционно-приспособительную реакцию растений к условиям техногенной среды, которая достигается путем активации компенсаторных реакций, регулирующих эффективность защитных систем растительной клетки и, таким образом, снижающих воздействие данного стрессового фактора. В условиях хронического умеренного воздействия повреждающего фактора метаболизм древесных растений находится на уровне, который определен не генетическими возможностями растений, а необходимостью компенсировать затраты на стрессовый метаболизм. В момент наступления пороговых значений лимитирующих факторов, происходит нарушение баланса обменных процессов и гибель растения (Судачкова, 1998).

Пероксидаза сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) чувствительна в отношении одного из компонентов выхлопных газов - HNO_3 . Этот установленный в работе экспериментальный факт позволяет утверждать, что пероксидаза хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) может служить биоиндикатором по отношению этого компонента (HNO_3) не только в выхлопных газах, но и в любых других субстанциях. Кроме того, полученные собственные данные по пероксидазе хвои делают возможным сформировать молекулярный механизм влияния HNO_3 разных концентраций на ферментативное поведение этого биокатализатора.

Учитывая, что хвойные способны накапливать токсиканты вследствие длительного периода жизни хвои, а также из-за ограниченности адаптационных возможностей растений, можно предположить, что при сохранении данного уровня загрязнения атмосферы устойчивость растений к воздействию поллютантов может снизиться, и в дальнейшем возможно развитие уже необратимых процессов деградации лесных экосистем.

5.6. Список литературы

1. Родзевич Н.Н. Экологическая глобализация // География в школе. - 2005. - № 4. - С.8 - 15.
2. Воскресенская, О.Л. Экология города Йошкар-Олы / О.Л. Воскресенская, Е.А. Алябышева и др. – Йошкар-Ола, 2004. – 200 с.
3. Калверт, С. Защита атмосферы от промышленных загрязнений / С Калверт, Г. Инглунд. – М.: Металлургия, 1988. – 286 с.
4. Илькун, Г.М. Загрязнители атмосферы и растения / Г.М. Илькун. – Киев: Наукова думка, 1978. – 246 с.
5. Сергейчик, С.А. Древесные растения и оптимизация промышленной среды / С.А. Сергейчик. - Минск: Наука и техника, 1984. – 168 с.
6. Соловьева, О.С. Функциональные и физиологические особенности древесных растений в условиях городской среды: автореферат / О.С. Соловьева. – Йошкар-Ола, 2003. – 22 с.
7. Битюкова, В.Р. Тенденции атмосферного загрязнения в городах России / В.Р. Битюкова, А.А. Попов // Экол. пром-ть России. – 2004. С.4 – 7.
8. Майснер, А.Д. Жизнь растений в неблагоприятных условиях / А.Д. Майснер. – Минск: Высш. школа, 1981. – 98с.
9. Горышина, Т.К. Растение в городе / Т.К. Горышина. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1991. – 148 с.
10. Созинова т. В., Носова е. В., Шишелова т.н., Носов а. В. Методы по снижению воздействия автотранспорта на окружающую среду // фундаментальные исследования. – 2005. – № 1 – стр. 56-57
11. Рябинин, В.М. Лес и промышленные газы / В.М. Рябинин. - М., 1965. – 297 с.
12. Руденко Б. Цена цивилизации // Наука и жизнь. - 2004. - № 7. - С.32 - 36.
13. Суэтин А. 2009 год: мир сегодня и завтра (обзор основных положений доклада «Состояние планеты - 2009») // Вопросы экономики. - 2009. - № 4. - С.90 - 103.
14. Гетко, Н.В. Растения в техногенной среде: Структура и функция ассимиляционного аппарата / Н.В. Гетко. – Минск: Наука и техника, 1989. – 208 с.

15. Петров В.В. 'Мир лесных растений' - Москва: 'Наука', 1978 - с.168.
16. Казанцева Л.К., Тагаева Т.О. Современная экологическая ситуация в России // ЭКО. - 2005. - № 9. - С.30 - 45.
17. Тарабрин, В.П. Устойчивость древесных растений в условиях промышленного загрязнения среды: автореферат / В.П Тарабрин. – Киев, 1974. – 364 с.
18. Соловьева, О.С. Пылезадерживающая способность древесных растений в зонах разного загрязнения г. Йошкар-Олы / О.С. Соловьева // Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды. Ч. 1.- Тольятти: ВуиТ, 2004. – С. 256 – 261.
19. Илькун, Г.М. Отфильтровывание воздуха от поллютантов древесными растениями / Г.М. Илькун. - Таллин, 1982. – 138 с.
20. Косулина, Л.Г. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды / Л.Г. Косулина, Э.К. Луценко, В.А. Аксенова. – Ростов н/Д : Изд-во Рост. ун-та, 1993. – 240 с.
21. Тутаюк, В.Х. Анатомия и морфология растений / В.Х. Тутаюк. – М., 1972. – 335 с.
22. Исаченко, Х.М. Влияние задымляемости на рост и состояние древесной растительности / Х.М. Исаченко // Сов. ботаника - 1938. - №1. - С. 118-123.
23. Николаевский, В.С. Современное состояние проблемы газоустойчивости растений / В.С. Николаевский. – Пермск. ун-т, 1969.
24. Хвастунов, А.И. Экологические проблемы малых и средних промышленных городов: оценка антропогенного воздействия / А.И. Хвастунов. – Йошкар-Ола: МарГТУ, 1999. – 248 с.
25. Николаевский, В.С. Биологические основы газоустойчивости растений / В.С. Николаевский. – Новосибирск: Наука, 1979. – 280 с.
26. Соловьева, И.Н. Глобальные изменения среды обитания древесных растений. Монография / И.Н. Павлов. - Красноярск: СибГТУ, 2003. – 156 с.
27. Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение / В. А. Алексеев [и др.]. – Л.: Наука, 1990. – 197 с.
28. Гудериан, Р. Загрязнение воздушной среды / Р. Гудериан. – М.: Мир, 1979. – 200 с.

29. Романова, А.К. Физиолого-биохимические признаки и молекулярные механизмы адаптации растений к повышенной концентрации CO₂ в атмосфере / А.К. Романова // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, №1. – С. 123-132.
30. Кулагин, Ю.З. Древесные растения и промышленная среда / Ю.З. Кулагин. М.: Наука, 1974. – 127 с.
31. Шацкая, Р.М. Влияние промышленной среды на содержание азотистых соединений в древесных растениях / Р.М. Шацкая, к.б.н. // автореферат. – Кишинев, 1983. – 22 с.
32. Николаевский, В.С. Роль растительности в регуляции чистоты атмосферного воздуха / В. С. Николаевский. – Л., 1978. – 277 с.
33. Крокер В. Рост растений \В. Крокер.- М: Изд-во иностр. лит-ры,1950.- 250с.
34. Николайкин, Н.И. Экология / Н.И. Николайкин, Н.Е. Николайкина, О.П. Мелехова.– М.: Дрофа, 2003. – 624 с.
35. Алексеев В.А. Некоторые вопросы диагностики и классификации поврежденных загрязнением лесных экосистем // Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. Л.: Наука, 1990. - С.38-54.
36. Мокроносов, А.Т. Фотосинтез: физиолого-экологические и биохимические аспекты / А.Т. Мокроносов, В.Ф. Гавриленко. – М., 1992. – 236 с.
37. Трахтенберг, И.М. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты / И.М. Трахтенберг, В.С. Колесников, В.П. Луковенко. – Минск: Наука и техника, 1994. – 286 с.
38. Загрязнение воздуха и жизнь растений / Под ред. Майкла Трешоу. – Л.: Гидрометеиздат, 1988. – 535 с.
39. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов.- СПб.: ГИОРД, 2004.-240с.
40. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений.-М.: Наука, 1988.- 128с.
41. Роговина В.В., Муравьева Р.А., Фомина В.А., Муштакова В.М. Пероксидазосомы клеток растений// Изв. РАН.Сер. биол.- 1996.-№ 1. С. 16-22

42. Лихуша П. С., Таланцева Ю. Н. Ферментативные параметры о-дифенолоксидазы льна // Сб. тез. XV Региональных Каргинских чтений – областной научно-технической конференции молодых учёных «Физика, химия и новые технологии». - Тверь, 2008. - с. 53.
43. Филипович Ю.Б. Основы биохимии: Учеб. для хим. и биол. спец. пед. ун-тов и ин-тов- 4-е изд., перераб. и доп.- М: изд-во «Агар», 1999. -512с.
44. Гиндуллина Т.М., Н.М. Дубова Хроматографические методы анализа. Изд-во Томского политехнического университета, 2010, -80с.
45. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. - Т.46, 2, - 1999. - С.321-336.
46. Дурмишидзе С.В., Девдариани Т.В. Биотрансформация ксенобиотиков в растениях. Тбилиси: Мецниерта, 1988. - 286 с.
47. Сергейчик С.А., Шахнович Е.А. Влияние азотсодержащих газообразных токсикантов на пигменты пластид различных видов деревьев // Основы биологического контроля загрязнения окружающей среды. Труды Ин-та геофизики. - 1988. - Вып.72. - С. 26-38.
48. Массель Г.И. Влияние атмосферного загрязнения двуокисью серы на метаболизм пихты сибирской // Экологическая физиология хвойных. Тез. докл. Межд. симп. - Красноярск, 1991. - С. 84.
49. Судачкова Н.Е. Состояние и перспективы изучения влияния стрессов на древесные растения // Лесоведение. 1998. - №2. - С. 3-9.

VI. Общее заключение

Общеизвестно, что в условиях техногенной среды у деревьев снижена ассимиляционная активность, наблюдается уменьшение содержания хлорофилла, изменяется строение хлоропластов, кислотность клеточного сока; под влиянием токсичных веществ снижается содержание аскорбиновой кислоты, нуклеиновых кислот, белков, клетчатки, слабеет способность выделять фитонциды, изменяется активность ферментов, нарушается водный режим растений.

В данной работе получены убедительные экспериментальные подтверждения о том, что:

- Лишайники чувствительны к воздействию автотранспортного загрязнения. Пероксидазу лишайников можно использовать в качестве индикаторов на придорожной полосе;

- Листья древесных растений, в частности березы бородавчатой, можно использовать как биоиндикатор загрязнения окружающей среды на основе исследования активности пероксидазы;

- Пероксидаза печеночницы благородной (*Нерatica nobilis*) может быть выбрана в качестве тестового фермента для изучения экологического состояния лесопарковых зон;

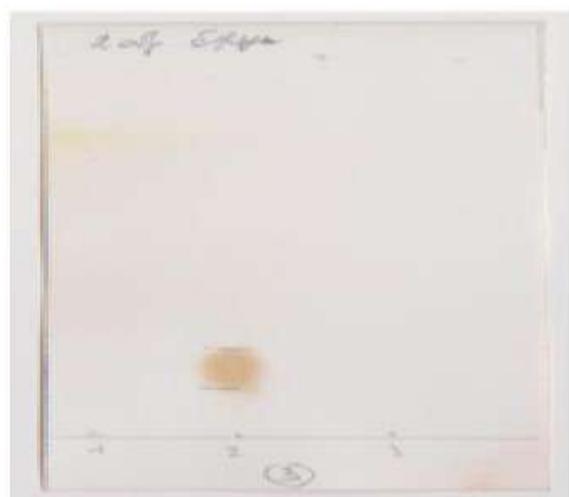
- Исследование ферментативного поведения пероксидазы хвои сосны обыкновенной дает важные и ценные сведения о развитии уже необратимых процессов деградации лесных экосистем.

ПРИЛОЖЕНИЕ

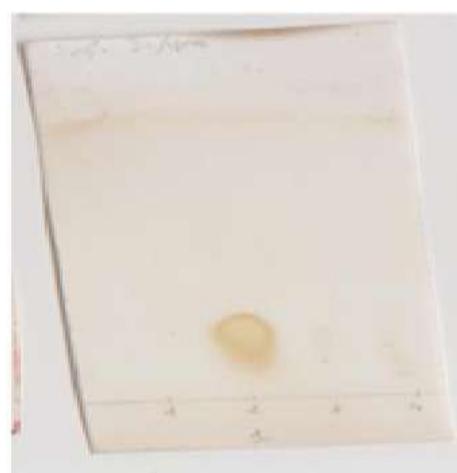
Образец 1.



Образец 2.

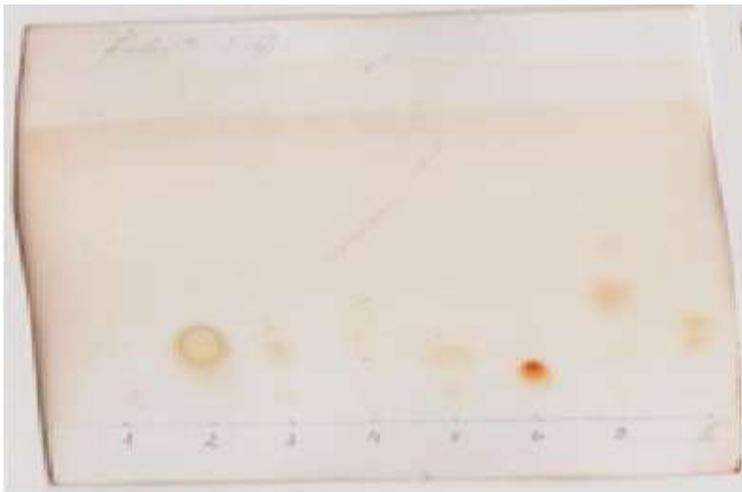


Образец 3.





Образец 4.



Образец 5.



Образец б.

А)

Б)

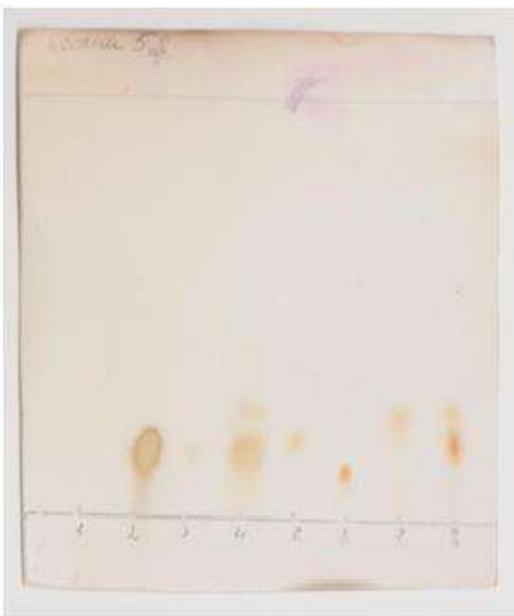
В)



Г)



Д)



Е)

