ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ *MISCANTHUS* × *GIGANTEUS* НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Муратова А.Ю.[1], Любунь Е.В.[1], Сунгурцева И.Ю.[1], Нуржанова А.А.[2], Турковская О.В.[1]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия
[2] Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Республика Казахстан
E-mail: muratova_a@ibppm.ru

В условиях лабораторного вегетационного опыта изучено влияние свинца (480 мг/кг) и цинка (1650 мг/кг) на физиологические и биохимические параметры растения *Miscanthus* × *giganteus*. В ходе эксперимента оценивались такие показатели как накопление биомассы растений, содержание фотосинтетических пигментов, активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы – СОД, каталазы – КАТ, аскорбатпероксидазы – АПО, глутатионредуктазы – ГР, глутатион-S-трансферазы – GST), а также содержание металлов в растительной биомассе и в почве. Показано, что цинк поглощался растением, аккумулируясь как в корнях (409 мг/кг), так и в побегах (485 мг/кг) мискантуса, что приводило к снижению накопления надземной и подземной биомассы почти вдвое. Свинец обнаруживался преимущественно в корневой системе (5 мг/кг), почти не транслоцируясь в надземные органы, что вызывало снижение прироста биомассы корней растений. Под влиянием тяжелых металлов в корнях и листьях мискантуса наблюдалось увеличение активности антиоксидантных ферментов СОД, АПО и GST, и снижение активности КАТ и ГР. Изменения активности ферментов под влиянием цинка были более выраженными по сравнению со свинцом. За 6 месяцев культивирования растений содержание цинка и свинца в почве снизилось на 5 и 3% соответственно. Полученные данные позволяют отнести *M.* × *giganteus* в отношении цинка к растениям-аккумуляторам, а в отношении свинца – к растениям-исключателям.

Ключевые слова: *Miscanthus* × *giganteus*, свинец, цинк, антиоксидантные ферменты, фиторемедиация

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF *MISCANTHUS* × *GIGANTEUS* TO SOIL CONTAMINATION WITH HEAVY METALS

Muratova A.Yu.[1], Lyubun Y.V.[1], Sungurtseva I.Yu.[1], Nurzhanova A.A.[2], Turkovskaya O.V.[1]

[1] Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia
[2] Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan
E-mail: muratova_a@ibppm.ru

The effect of lead (480 mg/kg) and zinc (1650 mg/kg) on the physiological and biochemical parameters of *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu plant was studied in pot experiment. The plant biomass accumulation, the content of photosynthetic pigments, the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase — SOD, catalase — CAT, ascorbate peroxidase — APO, glutathione reductase — GR, glutathione S-transferase — GST), and the metal content in the plant biomass and in the soil were evaluated. It was shown that zinc was accumulated both in the roots (409 mg/kg) and in the shoots (485 mg/kg) of miscanthus that was resulted in a reduction of aboveground and underground biomass by almost a half. Lead was found rather in the root system (5 mg/kg) than in the aboveground organs of plant, which caused a decrease in root biomass accumulation. The increase in the activity of antioxidant enzymes SOD, APO and GST, and a decrease in the activity of CAT and GR were observed in the roots and in the leaves of miscanthus under the influence of heavy metal stress. Alterations in enzyme activity were more pronounced under the influence of zinc than lead. Over 6 months of plant cultivation, the content of zinc and lead in the soil reduced by 5 and 3%, respectively. The data obtained make it possible to classify *M.* × *giganteus* as phytoaccumulator in relation to zinc, and as phytoexcluder in relation to lead.

Keywords: *Miscanthus* × *giganteus*, lead, zinc, antioxidant enzymes, phytoremediation

Поступила в редакцию: 6.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-482-493

ВВЕДЕНИЕ

Высокие темпы промышленного и сельскохозяйственного развития привели к проблеме загрязнения земель тяжелыми металлами. Физические, химические и токсические свойства этих загрязнителей приводят к ухудшению качества почв, накоплению металлов в живых организмах и их перемещению по пищевой цепи. Современной технологией очистки почв от тяжелых металлов, экономически выгодным и экологически приемлемым решением является фиторемедиация – использование растений и ассоциированных с ними микроорганизмов. Успех фиторемедиации зависит от различных факторов и, прежде всего, от специфических, генетически определенных свойств растений: проявлять устойчивость и способность к накоплению металлов и формировать большую биомассу. Этим требованиям в полной мере отвечает растение *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu (мискантус гигантский) – биоэнергетический вид второго поколения, проявляющий свойства фиторемедианта тяжелых металлов. Интерес к нему связан с тем, что это растение способно произрастать на маргинальных и заброшенных залежных землях, сохраняя свою высокую продуктивность и проявляя способность к очистке почв от неорганических и органических загрязнителей [Techer et al., 2012; Pidlisnyuk et al. 2014; Nsanganwimana et al., 2014; Figala et al., 2015]. Важной особенностью мискантуса гигантского является способность накапливать ионы тяжелых металлов преимущественно в корнях, что позволяет получать надземную биомассу этого растения на загрязненной металлами почве и использовать ее в качестве возобновляемого источника энергии для производства биотоплива в виде дробленки, брикетов, пеллет и пробки [Zub and Brtncourt-Hulmel, 2010]. Мискантус гигантский – стерильное растение, но может произрастать на одном участке более 20 лет, расселяясь с помощью разрастающихся частей стебля – ризом, таким образом, отпадает необходимость ежегодного сбора и посева семян. Перечисленные особенности *M.* × *giganteu*s способствуют его растущей популярности в исследованиях, связанных с возможностью получения биомассы биоэнергетических видов растений на загрязненных почвах с целью рационального использования земельных ресурсов.

Способность проявлять устойчивость к различному уровню загрязнения почвы тяжелыми металлами, в частности цинком и свинцом, была выявлена у растений *M.* × *giganteus* ранее [Kocon and Matyka, 2012; Kocoń and Jurga, 2017; Krzyżak et al., 2017]. Однако подробные исследования физиолого-биохимического ответа этого растения на поллютантный стресс, вызванный этими токсикантами, весьма ограничены. В частности, недостаточно изучена реакция ферментов антиоксидантной защиты у мискантуса гигантского в присутствии цинка и/или свинца.

Целью представленной работы являлось получение характеристик физиологического и биохимического ответа *M.* × *giganteus* на загрязнение почвы тяжелыми металлами (Zn^{2+}и Pb^{2}) в условиях лабораторного вегетационного опыта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторный вегетационный опыт

Использованная в экспериментах почва была представлена черноземом слабовыщелоченным маломощным. Согласно данным проведенных анализов исследуемая почва являлась суглинистой, мелко гранулированной (<0,25 мм – 68,5%; 0,5–0,25 мм – 31,1%; 0,5–1 мм – 0,23%; 1–3 мм – 0,036%); слабокислой (pH 5,64), со средним содержанием

растворимых фосфатов (P_2O_5, 64 мг/кг) и доступных минеральных форм азота (NO_3^-, 36 мг/кг; NH_4^+, 32 мг/кг).

Для получения загрязненного грунта воздушно-сухую почву просевали через сито с диаметром ячеек 7 мм, фасовали по 6 кг и обрабатывали раствором солей тяжелых металлов ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ или $Pb(NO_3)_2$) до концентраций ионов Zn^{2+}или Pb^{2+} 1650 и 480 мг/кг, соответствующих 15 ПДК [ГН 2.1.7.020-94]. Чистая почва, обработанная дистиллированной водой, использовалась в качестве контроля. Подготовленную почву оставляли на 3 сут для равномерного распределения загрязнителя, после чего отбирали образцы для анализов и использовали в вегетационном опыте.

Для посадки растений 10-литровые вегетационные сосуды заполняли, насыпая на дно в качестве дренажа керамзит (1000 г; диаметр гранул 1,5 – 2,0 см). Дренаж закрывали марлей, сверху насыпали речной песок (1000 г) и снова закрывали марлей. Затем сосуд заполняли почвой (3000 г по сухому весу). В подготовленные сосуды высаживали ризомы мискантуса (2 шт. на сосуд). Поверхность почвы засыпали песком (200 г). Опыты ставили в двух повторностях. Контролем служил вариант с незагрязненной металлами почвой. Полив растений осуществляли ежедневно отстоянной водопроводной водой, поддерживая влажность почвы на уровне 50% от полной влагоемкости. Необходимость полива определяли взвешиванием сосудов. Выращивание растений проводили в условиях теплицы при температуре 24-28/20-22 °С и естественном освещении в течение 6 мес.

Анализ растений

Один раз в месяц в течение всего периода культивирования проводили измерение длины побегов растений. По окончании культивирования растения извлекали из сосудов, корни обтряхивали и отмывали от почвы. Побеги и корни отделяли от ризом, готовили навески для биохимических анализов, оставшуюся биомассу взвешивали и высушивали до постоянного веса при 70°С. Биохимические анализы включали в себя определение содержания в листьях пигментов фотосинтеза и измерение активности ферментов.

Для определения содержания хлорофиллов *a* и *b* (Хл *a* и Хл *b*) и каротиноидов навески листьев (40 мг) растирали с кварцевым песком и $CaCO_3$ в 5 мл охлажденного 96% этанола. Гомогенат центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин, супернатант использовали для анализа, измеряя спектры поглощения пигментов в смеси в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм с помощью спектрометра Evolution 60 (Thermo Scientific, USA). Концентрации Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов рассчитывали, используя максимумы поглощения пигментов при 665, 648 и 440.5 нм, соответственно, по уравнениям, предложенным в работах [Wintermans and de Mots, 1965; von Wettstein, 1957].

Для определения активности растительных ферментов навески побегов и корней (0,2 – 0,3 г) растирали в ступке с кварцевым песком и ресуспендировали в 2 мл 0,2 М Na/K-фосфатного буфера (pH 6.0). Гомогенат центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Полученные супернатанты использовали для спектрофотометрического определения активности ферментов и содержания белка с использованием спектрометра Evolution 60 (Thermo Scientific, США). В гомогенатах корней и побегов определяли активности ключевых антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.12.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.16), аскорбатпероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11), глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) и глутатион-S-трансферазы (GST, КФ 2.5.1.18).

Содержание белка определяли методом Брэдфорд [Bradford, 1976]. Определение активности антиоксидантных ферментов проводили согласно протоколу [Elavarthi and

Martin, 2010]. Коротко, измерение активности СОД проводили при λ=560 нм, определяя восстановление 55 мМ нитросинего тетразолия хлорида супероксидным радикалом с образованием моноформазона в присутствии 9,9 мМ L-метионина, 1 мМ рибофлавина, 0,025% тритона X-100 в 0,05М K-фосфатном буфере (pH 7,8) с 2 мМ EDTA. Активность КАТ измеряли по разложению 10 мМ H_2O_2 (ε=43,6 M^{-1} $см^{-1}$) в 0,05 М K-фосфатном буфере (pH 7,0), определяемому как снижение поглощения реакционной смеси при λ=240 нм. Активность АПО измеряли по окислению 0,5 мМ аскорбиновой кислоты в 0,05 М K-фосфатном буфере (pH 7,0) в присутствии 0,5 мМ H_2O_2. при λ=290 нм. Активность ГР измеряли по образованию 2-нитро-5-тиобензойной кислоты в результате восстановления 0,75 мМ 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты в присутствии 1 мМ окисленного глутатиона, 0,1 мМ НАДФ Н в 0,05 М K-фосфатном буфере (pH 7,8) с 2 мМ EDTA при λ=412 нм. Активность GST измеряли по образованию продукта в реакционной смеси, содержащей 0,1 М 2,4-динитрохлорбензол, 1 М восстановленный глутатион в 0,05 М K-фосфатном буфере (pH 7,8) при λ=340 нм [Gronwald and Plaisance, 1998; Schröder et al., 2009].

Активность ферментов выражали в мкмоль окисленного субстрата в минуту (Ед.) на миллиграмм белка.

Определение содержания металлов в почве и биомассе растений

Содержание цинка и свинца в почве и в растительной биомассе определяли с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии. Предварительная подготовка проб состояла в высушивании образцов до постоянного веса при температуре 70°C. Затем образцы измельчали в шаровой мельнице. После тщательного перемешивания пробу распределяли равномерным слоем и отбирали методом квартования необходимое для анализа количество образца. К высушенным до постоянного веса образцам добавляли концентрированную HNO_3 и 30% раствор H_2O_2. При постоянном контроле температуры образцы оставляли на 15 мин для предварительного кислотного разложения, после чего переносили в микроволновую печь закрытого типа MARS Xpress (США), где, выбрав соответствующую количеству проб программу, подвергали их минерализации. После завершения программы минерализации автоклавы охлаждались, пробы отфильтровывали в мерную пробирку 10 мл через фильтр с белой лентой, многократно ополаскивая автоклав и фильтр бидистиллированной водой, и доводили объем фильтрата до объема 10 мл. В получившемся растворе определяли металл.

Измерения проводили на атомно-абсорбционном спектрометре Thermo Scientific iCE 3500 (Thermo Scientific, США). В качестве источника света использовались лампы полого катода. Для градуировки спектрометра использовались ГСО растворов соответствующих металлов. Все реактивы, использованные в работе, имели квалификацию «осч». Измерения проводили в трехкратной повторности.

Для каждого исследуемого металла вычисляли транслокационный и биоаккумуляционный факторы. Транслокационный фактор (ТФ), отражающий способность растения транспортировать и накапливать металлы в побеги, рассчитывался как отношение концентрации металла в побегах к концентрации металла в корнях. Биоаккумуляционный фактор (БФ), характеризующий способность растения поглощать металлы из почвы, рассчитывался как отношение концентрации металла в биомассе растений к концентрации металла в почве.

Статистическая обработка

Все полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке, вычисляя средние значения, для сравнения которых использовали показатели стандартного

отклонения и доверительного интервала при $P \leq 0{,}05$. Вычисления проводили в программе Microsoft Excel 2007 (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка роста M.× giganteus в условиях вегетационного опыта

Наблюдения за развитием *M.× giganteus* на протяжении всего периода эксперимента показали, что в чистой почве растения отличались большим кущением по сравнению с растениями, выращиваемыми в присутствии загрязнителей (рис.1А, Б). При этом увеличение длины побегов в контрольном варианте происходило медленнее, чем в загрязненной почве, что, вероятно, было связано с увеличением кущения растений в чистом грунте. Присутствие тяжелых металлов в почве оказывало выраженный токсический эффект на накопление растительной биомассы, особенно надземной (рис. 1В). По сравнению с контролем общая надземная биомасса растений в загрязненной свинцом и цинком почве была на 21 и 58% меньше, чем в контроле. Ингибирование корневой системы мискантуса под влиянием тяжелых металлов было схожим и достигало 46 и 43% соответственно для свинца и цинка.

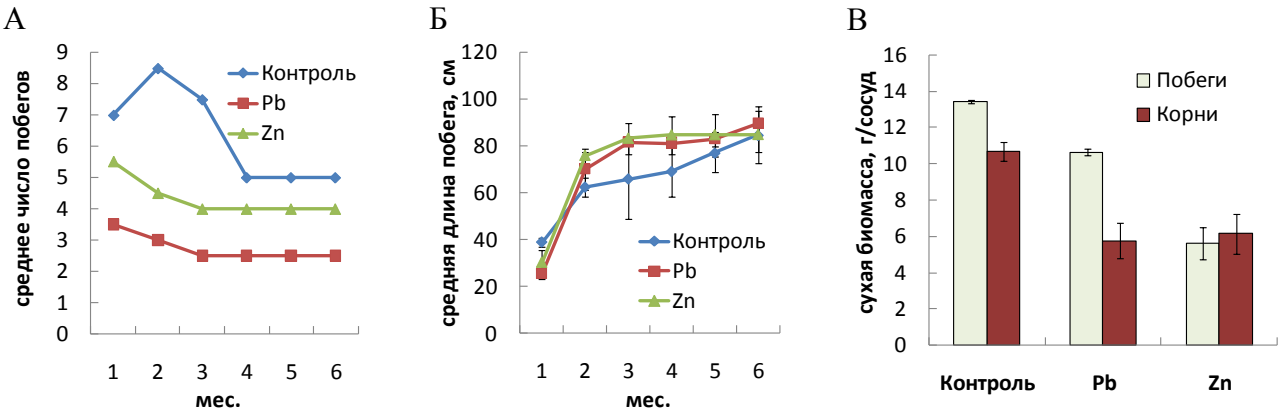

Рис. 1. Влияние тяжелых металлов на рост и развитие растений *M.× giganteus*
А – кущение растений; Б – высота растений; В – накопление биомассы растений

Из приведенных данных видно, что по сравнению со свинцом загрязнение почвы цинком оказывало большее ингибирующее воздействие на растения мискантуса, снижая накопление как надземной, так и подземной биомассы почти вдвое, что было связано с большим поглощением цинка растением. Свинец оказывал ингибирующий эффект преимущественно на корни, а не на побеги растения, т.к. проникал лишь в корневую систему, почти не транслоцируясь в другие органы мискантуса (см. рис. 3).

Влияние тяжелых металлов на фотосинтетические пигменты M.× giganteus

Вариации фотосинтетических пигментов под действием неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе, загрязнителей, приводят к изменению активности фотосинтетического аппарата, скорости накопления ассимилянтов, что, в конечном итоге, отражается на росте и продуктивности растений. Известно, что стрессовые условия, в том числе, вызванные присутствием в окружающей среде тяжелых металлов, оказывают выраженный ингибирующий эффект на фотосинтетический аппарат растений [Tran and Popova, 2013]. Отмечаются нарушения структуры и функции хлоропластов, снижается количество и соотношение фотосинтетических ферментов, что является следствием как

торможения биосинтеза, так и деградации хлорофилла [Zengin and Munzuroglu, 2005; Tran and Popova, 2013]. Являясь фундаментальными параметрами фотосинтетической активности такие показатели, как суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* и их соотношение, часто используются в качестве индикатора стресса растений.

Анализ фотосинтетических пигментов в растениях мискантуса (табл. 1), позволил выявить токсический эффект свинца, который выражался в снижении содержания хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов на 22, 21 и 15 %. Достоверных изменений фотосинтетических пигментов под влиянием цинка не было обнаружено, но отмечалось небольшое увеличение соотношения хлорофиллов *a*/*b*, что также может указывать на фитотоксическое действие этого металла. В целом, негативное влияние свинца и цинка на фотосинтетический аппарат мискантуса было слабо выражено, что согласуется с ранее опубликованными данными [Нуржанова и др., 2016] и может дополнительно свидетельствовать об устойчивости этого растения к исследуемым металлам.

Таблица 1. Влияние загрязнения почвы тяжелыми металлами на фотосинтетические пигменты листьев *M.× giganteus*

Вариант опыта	Хл *a*, мг/г	Хл *b*, мг/г	Сумма Хл *a* и *b*, мг/г	Хл *a* / Хл *b*	Каротиноиды, мг/г
Контроль	1.37 ± 0.17	0.38 ± 0.03	1.75 ± 0.20	3.60 ± 0.05	0.40 ± 0.06
Загрязнение Pb	1.07 ± 0.20	0.30 ± 0.07	1.37 ± 0.17	3.61 ± 0.04	0.34 ± 0.05
Загрязнение Zn	1.28 ± 0.19	0.35 ± 0.08	1.64 ± 0.27	3.66 ± 0.06	0.40 ±0.06

Влияние тяжелых металлов на активность антиоксидантных ферментов M.× giganteus

Известно, что при загрязнении среды в растении наблюдается изменение активности ферментов антиоксидантной защиты (ФАЗ), что способствует снижению уровня активных форм кислорода (АФК), к избыточному образованию которых приводит поллютантный стресс. К таким ферментам относятся СОД, КАТ, пероксидазы, а также ферменты аскорбат-глюатионового цикла – АПО, ГР, GST и глутатионпероксидаза [Титов и др., 2014]. Возрастание активности под действием стресс-фактора является следствием синтеза ферментов *de novo* [Foyer et al., 1997; Титов и др., 2014]. Предполагается, что существуют видоспецифические различия в регуляции индукции ФАЗ: одни растения сильнее индуцируют ферменты первичной защиты, такие как СОД, КАТ, пероксидазы, а другие – ферменты глутатионового цикла, обеспечивающие растительные клетки высокой концентрацией антиоксидантов [Schröder et al., 2009].

В качестве индикаторов реакции *M.× giganteus* на стресс, вызванный загрязнением почвы тяжелым металлом, мы определяли активность ферментов СОД, КАТ, ГР, GST и АПО. Согласно полученным результатам (рис.2) под влиянием тяжелых металлов в растениях мискантуса наблюдалось увеличение активности одних ферментов (СОД, АПО и GST) и снижение активности других (КАТ и ГР). При этом активность всех исследованных ферментов в корнях растений была выше, чем в листьях, а ее изменения под влиянием цинка были более выраженными по сравнению со свинцом.

СОД является одним из ключевых компонентов системы защиты клеток и тканей от окислительной деструкции, обеспечивая «первую линию» защиты клеток от АФК [Alscher et al., 2002]. Фермент нейтрализует активный кислород, катализируя реакцию дисмутации супероксид-радикала с образованием перекиси водорода, в различных компартментах клетки.

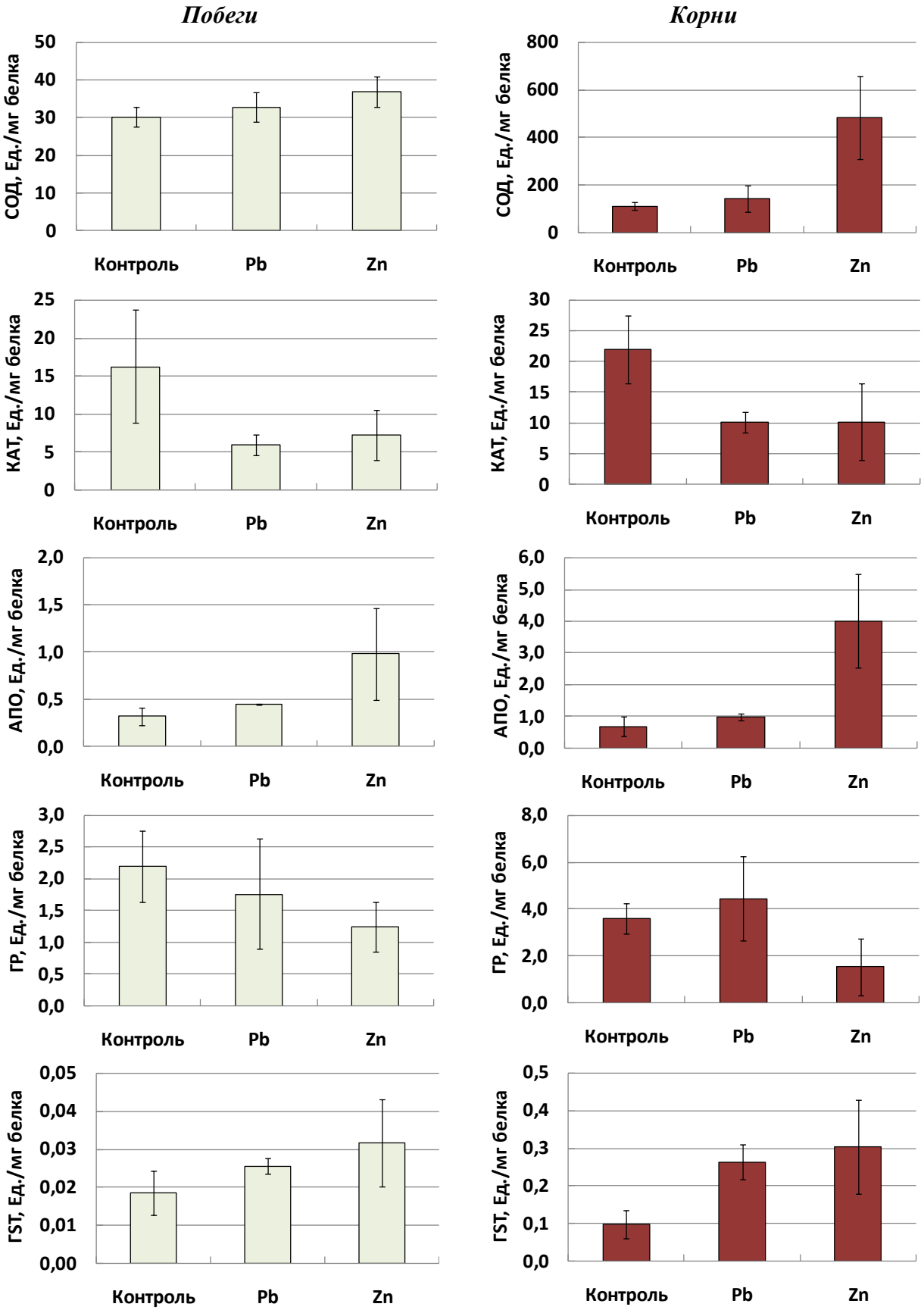

Рис. 2. Влияние загрязнения почвы тяжелыми металлами на активность ферментов антиоксидантной защиты в побегах и корнях растений *M.*× *giganteus*: СОД – скупероксиддисмутазы, КАТ – каталазы, АПО – аскорбатпероксидазы, ГР – глутатионредуктазы, GST – глутатион-S-трансферазы

Через 6 мес. культивирования, активность СОД, как в корнях, так и в листьях мискантуса, выращенного в загрязненной металлами почве, была выше, чем в контрольных растениях. Причем, цинк в большей степени, чем свинец стимулировал активность этого фермента. В листьях и в корнях растений под влиянием свинца активность СОД была на 9 и 22%, а под влиянием цинка – на 26 и 330% выше, чем в контроле соответственно. Ранее было описано изменение активности СОД в корнях и листьях родственного растения *M. sinensis* в ответ на присутствие в среде кадмия [Scebba et al., 2006]. Авторы показали зависимость изменения активности СОД от концентрации и продолжительности стрессового воздействия.

В результате дисмутации супероксид-радикалов под действием разных изоформ СОД происходит образование перекиси водорода. В связи с этим необходимым звеном антиоксидантной защиты растений является группа ферментов, ликвидирующих перекись водорода [Гарифзянов, 2011], среди которых важнейшую роль играют каталаза и пероксидазы.

КАТ – фермент антиоксидантной защиты, который всегда присутствует в системах, где происходят процессы клеточного дыхания с участием цитохромов, т.е. там, где в результате восстановления кислорода образуется перекись водорода. В пероксисомах этот фермент с высокой скоростью разлагает перекись водорода до воды и кислорода, но поскольку имеет низкое сродство к перекиси водорода, начинает функционировать только при относительно высоких ее концентрациях в клетке [Гарифзянов, 2011]. К концу описываемого эксперимента активность этого фермента в корнях и листьях мискантуса гигантского из загрязненной металлами почвы была более, чем на 50% ниже, чем в контрольных растениях. Учитывая, что активность ферментов зависит от продолжительности воздействия стресс-факторов и сопровождается изменением активности других сопряженных ферментов [Panda et al., 2003; Титов и др., 2014], можно предположить, что активность КАТ могла увеличиться в ответ на загрязнение почвы металлами на ранних этапах роста растений, а к концу эксперимента снизиться на фоне повышения активности других антиоксидантных ферментов, задействованных в детоксикации перекиси водорода. Это предположение подтверждается увеличением активности АПО в листьях и корнях *M.* × *giganteus* соответственно на 40 и 45% – в случае свинца, на 200 и 490% – в случае цинка. Повышение активности АПО в листьях и корнях другого вида мискантуса (*M. sinensis* (cv. Giganteus)) наблюдали под воздействием кадмия, присутствующего в гидропонной среде в концентрации 2,2 мкмоль/л [Scebba et al., 2006], однако при более высоком содержании металла (4,4 и 6,6 мкмоль/л) активность этого фермента ингибировалась. Таким образом, наблюдаемая нами повышенная активность АПО в ответ на присутствие свинца и цинка может свидетельствовать о способности *M.* ×*giganteus* противостоять токсическому воздействию исследуемых концентраций тяжелых металлов в почве.

Участие АПО в антиоксидантном ответе растения на стресс сопряжено с активностью других ферментов аскорбат-глутатионового цикла, ключевым ферментом которого является ГР. ГР катализирует реакцию восстановления глутатиона, сопровождающуюся окислением НАДФ Н, участвует в поддержании необходимого пула восстановленного глутатиона в клетке, уровень которого снижается в присутствии тяжелых металлов в связи с его расходованием на синтез фитохелатинов. В присутствии свинца активность ГР в листьях мискантуса снижалась на 20%, а в корнях достоверно не изменялась, тогда как под влиянием цинка активность ГР ингибировалась на 44 и 58% соответственно в листьях и корнях растений.

Противоположный характер ответа на присутствие металлов-токсикантов в почве отмечался для GST. Этот фермент играет важную роль в инактивации продуктов окислительных нарушений биомолекул, образованных вследствие повышенного уровня активных форм кислорода в клетке – катализирует конъюгацию восстановленной формы глутатиона с разнообразными гидрофобными и электрофильными субстратами, участвует в восстановлении аскорбата из дегидроаскорбата и в детоксикации липидных радикалов, образованных в процессе перекисного окисления липидов. GST – универсальный инструмент клеточной системы для утилизации ксенобиотиков не только в растениях, но и в других организмах. Известно участие GST в конъюгации широкого спектра гербицидов и других органических поллютантов [Schröder et al., 2009; Kvesitadze, 2013]. Кроме органических токсикантов, этот фермент может связывать с глутатионом и тяжелые металлы [Rauser, 1995]. Последний факт может объяснять увеличение активности GST под влиянием исследуемых нами металлов. Так, под влиянием свинца активность GST увеличилась на 38 и 167%, а под влиянием цинка – на 70 и 207% соответственно в листьях и корнях растений.

Проведенное исследование позволило охарактеризовать реакции антиоксидантных ферментов *M. ×giganteus* на поллютантный стресс, вызванный присутствием в среде культивирования свинца и цинка. Полученные результаты дополняют ранее опубликованные данные об изменении активности антиоксидантных ферментов мискантуса под действием кадмия [Scebba et al., 2006] холодового [Płażek et al., 2009] и солевого [Hong et al., 2014] стресс-факторов.

Содержание металлов в почве и в биомассе M. ×giganteus

Анализ металлов в биомассе растений показал (рис.3), что *M.× giganteus* достаточно активно аккумулировал цинк как в корнях (408,6 ± 5,2 мг/кг), так и в побегах (484,6 ± 92,6 мг/кг). Отмечалась тенденция к преимущественному накоплению цинка в побегах.

Свинец в биомассе мискантуса обнаруживался преимущественно в корнях, где его концентрация была на два порядка меньше по сравнению с цинком. Это иллюстрирует низкую биодоступность этого металла для растений *M.× giganteus*, что согласуется с результатами других исследований [Kocon and Matyka, 2012; Nurzhanova et al., 2019].

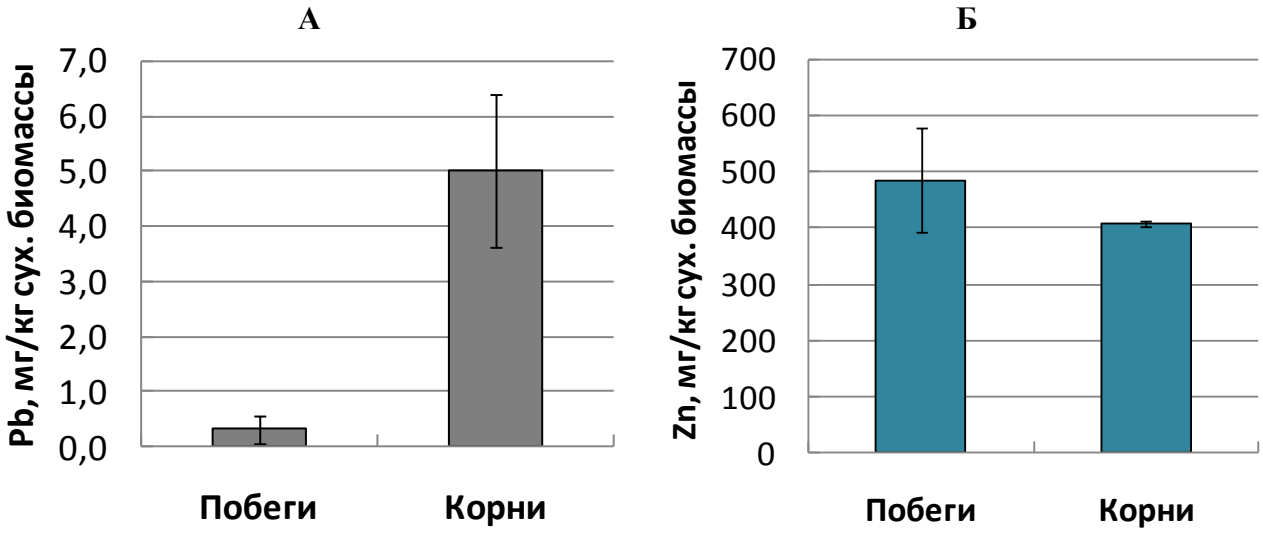

Рис. 3. Поглощение тяжелых металлов растениями
А – свинец; Б – цинк

Оценивая возможность транслокации поглощенных металлов в органы растения, были рассчитаны показатели ТФ в отношении цинка и свинца, которые составили 1,08 и 0,55 соответственно. Как видно, значение, полученное для цинка ≥ 1, что указывает на способность мискантуса накапливать этот металл в своих побегах в концентрации не меньшей, чем в корнях. Аналогичные данные для мискантуса и цинка были получены другими исследователями [Korzeniowska and Stanislawska-Glubiak, 2015]. И, наоборот, значение ТФ, полученное для свинца < 1, что свидетельствует об отсутствии накопления этого металла в надземной биомассе растения. Большее накопление цинка по сравнению со свинцом в биомассе *M.× giganteus* отмечалось также и в других работах [Kocon and Matyka, 2012; Nurzhanova et al., 2019], что позволяет отнести *M.× giganteus* в отношении цинка к группе растений-аккумуляторов, а в отношении свинца – к растениям-исключателям.

Анализ содержания тяжелых металлов в почве до и после вегетационного опыта позволил оценить эффективность использования *M.× giganteus* для очистки загрязненного грунта (табл. 2).

Таблица 2. Изменение содержания тяжелых металлов в почве и эффективность ее фиторемедиации с использованием *M.× giganteus* за 6 месяцев вегетационного опыта

Загрязнитель	Содержание, мг/кг		Очистка почвы, %	БФ
	Исходное	Конечное		
Свинец	456.9 ± 31.6	443.01 ± 21.9	3.04	0.00002
Цинк	1494.2 ± 27.8	1417.5 ± 37.3	5.13	0.00123

Как видно из представленных данных, за 6 месяцев культивирования растений в почве, загрязненной цинком и свинцом в концентрациях 15 ПДК, содержание тяжелых металлов снизилось несущественно – на 3 и 5% соответственно. Такая невысокая эффективность фиторемедиации может быть связана с низкой способностью исследованных металлов накапливаться в растениях *M.× giganteus*, на что указывает величина показателя БФ. При этом, значение БФ для свинца на несколько порядков ниже, чем для цинка, что совпадает с ранее опубликованными данными [Kocon and Matyka, 2012; Kocoń and Jurga, 2016] и подтверждает характеристику мискантуса гигантского как растения-исключателя. Кроме того, для столь высокого уровня загрязнения период очистки почвы, вероятно, должен быть более продолжительным.

В целом, проведенное исследование позволило выявить существенное влияние цинка и свинца на рост и физиолого-биохимический статус мискантуса гигантского, выращенного в почве, содержащей тяжелые металлы в концентрациях, соответствующих 15 ПДК. Несмотря на снижение прироста биомассы *M.× giganteus* в загрязненном грунте, было установлено отсутствие значительного влияния металлов на фотосинтетический аппарат, а также показана активация системы ферментативной антиоксидантной защиты растения, что позволяет характеризовать мискантус гигантский как устойчивое и активно сопротивляющееся поллютантному стрессу растение. Продолжение исследований в направлении поиска и применения перспективного микробного инокулянта для стимуляции роста растений *M.× giganteus* в загрязненной тяжелыми металлами почве, может улучшить показатели эффективности фиторемедиации почвы от цинка и свинца с использованием этого растения.

Работа выполнена в рамках темы госзадания (№AAAA-A17-117102740093-3) в части, посвященной изучению активности антиоксидантных ферментов, и при поддержке гранта Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект AP05131473).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений // Современные проблемы науки и образования. 2011. Т. 2. С. 2.
2. ГН 2.1.7.020-94 Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) тяжелых металлов и мышьяка в почвах с различными физико-химическими свойствами (валовое содержание, мг/кг). (Дополнение N 1 к перечню ПДК и ОДК N 6229-91). М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1995.
3. Нуржанова А., Нурмагамбетова А., Жаманбалинова Р., Балмуханов А., Сайлауханулы Е. Физиологические и биохимические особенности *Miscanthus* × *giganteus* в условиях загрязнения // Известия НАН РК Серия биологическая и медицинская. 2016. Т. 1. С. 103-109.
4. Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.
5. Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // Journal of Experimental Botany. 2002. V. 53, No. 372. P. 1331–1341. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1331
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. V. 72. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
7. Elavarthi S., Martin B. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants // In: Plant stress tolerance. Methods in molecular biology 639 / Ed. R. Sunkar. Springer Science+Buisness Media, LLC. 2010. P. 273–280. DOI: 10.1007/978-1-60761-702-0_16
8. Figala J., Vranová V., Rejšek K., Formánek P. Giant Miscanthus (*Miscantus*×*giganteus* Greef Et Deu.) – a promising plant for soil remediation: a mini review // Acta Universitatis Agriculturaeet Silviculturae Mendelianae Brunensis. 2015. V. 63. No. 6. P. 2241–2246. DOI: 10.11118/actaun201563062241
9. Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling // Physiologia Plantarum. 1997. V. 100. P. 241-254. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x
10. Gronwald J.W., Plaisance K.L. Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from Sorghum // Plant Physiology. 1998. V. 117. P. 877–892. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x
11. Hong C.T., Guo H.P., Fang J., Ren W., Wang T.F., Ji M.C., Zheng B.S. Physiological and biochemical responses of *Miscanthus sacchariflorus* to salt stress // Advanced Materials Research. 2014. V. 1051. P. 333–340. DOI: 10.4028/www.scientific.net/amr.1051.333
12. Kocoń A., Jurga B. The evaluation of growth and phytoextraction potential of *Miscanthus x giganteus* and *Sida hermaphrodita* on soil contaminated simultaneously with Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn // Environmental Science and Pollution Research. 2017. V. 24. P. 4990–5000. DOI: 10.1007/s11356-016-8241-5
13. Kocon A., Matyka M. Phytoextractive potential of *Miscanthus giganteus* and *Sida hermaphrodita* growing under moderate pollution of soil with Zn and Pb // Journal of Food, Agriculture and Environment. 2012. V. 10. P. 1253–1256.
14. Korzeniowska J., Stanislawska-Glubiak E. Phytoremediation potential of *Miscanthus* × *giganteus* and *Spartinapectinata* in soil contaminated with heavy metals // Environ Environmental Science and Pollution Research. 2015. V. 15. P. 11648–11657. DOI: 10.1007/s11356-015-4439-1
15. Krzyżak J., Pogrzeba M., Rusinowski S., Clifton-Brown J., McCalmont J.P., Kiesel A., Mangold A., Mos M. Heavy metal uptake by novel *Miscanthus* seed-based hybrids cultivated in heavy metal contaminated soil // Civil and Environmental Engineering Reports. 2017. V. 26. No. 3. P. 121–132. DOI: 10.1515/ceer-2017-0040

16. Kvesitadze G. Degradation of anthropogenic contaminants by higher plants // Biotechnologia Acta. 2013. V. 6. No. 4. P. 132–143. DOI: 10.15407/biotech6.04.132
17. Nsanganwimana F., Pourrut B., Mench M., Douay F. Suitability of Miscanthus species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review // Journal of Environmental Menagement. 2014. V. 143. P.123-134. DOI: 10.1016/j.jenvman.2014.04.027
18. Nurzhanova A., Pidlisnyuk V., Abit K., Nurzhanov C., Kenessov B., Stefanovska T., Erickson L. Comparative assessment of using *Miscanthus* × *giganteus* for remediation of soils contaminated by heavy metals: a case of military and mining sites // Environmental Science and Pollution Research. 2019. V. 26. No. 13. P. 13320–13333. DOI: 10.1007/s11356-019-04707-z
19. Panda S., Chaudhury I., Khan M. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves // Biologia Plantarum. 2003. V. 46. P. 289–294. DOI: 10.1023/A:1022871131698
20. Pidlisnyuk V., Erickson L., Kharchenko S., Stefanovska T. Sustainable land management: growing *Miscanthus* in soils contaminated with heavy metals // Journal of Environmental Protection. 2014. V. 5. P. 723-730. DOI: 10.4236/jep.2014.58073
21. Płażek A., Dubert F., Marzec K. Cell membrane permeability and antioxidant activities in the rootstocks of *Miscanthus* × *giganteus* as an effect of cold and frost treatment // Journal of Applied Botany and Food Quality. 2009. V. 82. P. 158—162.1
22. Rauser W.E. Phytochelatins and related peptides (structure, biosynthesis, and function) // Plant Physiology. 1995. V. 109. P. 1141–1149. DOI: 10.1104/pp.109.4.1141
23. Scebba F., Arduini I., Ercoli L., Sebastiani L. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis* // Biologia Plantarum. 2006. V. 50. No. 4. P. 688–692. DOI: 10.1007/s10535-006-0107-0
24. Schröder P., Lyubenova L., Huber C. Do heavy metals and metalloids influence the detoxification of organic xenobiotics in plants? // Environmental Science and Pollution Research. 2009. V. 16. P.795–804. DOI: 10.1007/s11356-009-0168-7
25. Techer D., Martinez-Chois C., Laval-Gilly P., Bennasroune A., Formanek P., D'Innocenzo M., Fall J. Assessment of *Miscanthus giganteus* for rhizoremediation of long-term PAH contaminated soils // Applied Soil. Ecology. 2012. V. 62. P. 42–63. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.07.009
26. Tran T.A., Popova L.P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects // Turkish Journal of Botany. 2013. V. 37. P. 1–13. DOI: 10.3906/bot-1112-16
27. von Wettstein D. Chlorophyll-letale und der submicroskoposche Formwechsel der Plastiden // Experimental Cell Research. 1957. V. 12. P. 427–506. DOI: 10.1016/0014-4827(57)90165-9
28. Wintermans J.F., de Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol // Biochimica et Biophysica Acta. 1965. V. 109. No. 2. P. 448–453. DOI: 10.1016/0926-6585(65)90170-6
29. Zengin F.K., Munzuroglu O., Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings // Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. 2005. V. 47. No. 2. P. 157–164.
30. Zub H.W., Brtncourt-Hulmel M. Agronomic and physiological perfonnances of different species of miscanthus, a major energy crop // Agronomy for Sustainable Development. 2010. V. 30. No. 2. P. 201-204. DOI: 10.1051/agro/2009034