



**СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ ВЪРХУ ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА НА ДВА РАСТИТЕЛНИ ТЕСТА ЗА ОЦЕНКА НА
МЕТАЛНА ФИТОТОКСИЧНОСТ**
**COMPARATIVE STUDY ON THE SENSITIVITY OF TWO PLANT TEST SYSTEMS FOR EVALUATION OF METAL
PHYTOTOXICITY**

Андон Василев*, Анна Николова
Andon Vassilev*, Anna Nikolova

Аграрен университет - Пловдив
Agricultural University - Plovdiv

* E-mail: vassilev@au-plovdiv.bg

Резюме

Сравнена е чувствителността на два растителни теста за оценка на метална токсичност. Тестовите се различават по използваните моделни растения и индикаторни параметри. Първият тест е разработен с фасулеви растения, а вторият – с краставици. Основни функционални индикатори във фасулевия тест са промени в активността на подобрани ензими, а в краставичия тест - фотосинтетични параметри. Двата теста са приложени за оценка на относителната фитотоксичност на комплексно замърсени с Cd, Zn и Cu субстрати. Установено е, че тестът с краставици растения има по-висока чувствителност към метална токсичност в сравнение с теста с фасулеви растения, тъй като идентифицира по-висока токсичност на анализирания субстрат. В допълнение, силно негово предимство е бързината на измерване на неструктурните фотосинтетични параметри – скорост на CO₂ асимилация и скорост на фотосинтетичния електронен транспорт.

Abstract

The sensitivity of two plant test systems for evaluation of metal phytotoxicity was compared. The two tests are differentiated by the used model plants and indicators. The first test was developed by making use of bean plants and the second one made use of cucumber plants. The changes in the activity of selected enzymes represent the basic functional indicators in the bean test, whereas the cucumber test is based on photosynthetic parameters. Both tests were applied towards the evaluation of the relative phytotoxicity of complexly contaminated by Cd, Zn and Cu substrates. It was established that the cucumber test had higher sensitivity to metal toxicity compared to the bean test as it identified higher toxicity of the analyzed substrates. In addition, one of its strong advantages is the speed of measurements of nondestructive photosynthetic parameters – CO₂ assimilation rate and apparent photosynthetic transport rate.

Ключови думи: фасул, краставици, тежки метали, растеж, фотосинтеза, ензимна активност, тест.

Key words: beans, cucumber, heavy metals, growth, photosynthesis, enzyme activity, test.

ВЪВЕДЕНИЕ

Растителните тестове навлизат все по-широко в екотоксикологичните изследвания. Това се дължи, от една страна, на водещата роля на растенията във формирането на първичната продуктивност на екосистемите, а, от друга, на променящото се становище относно тяхната чувствителност към различни ксенобиотици в сравнение с други биологични организми (Smith, 1978; Lewis, 1995; Hock and Elstner, 2005).

Различните групи токсиканти често имат сходни негативни ефекти върху интегралните физиологични процеси в растенията. Същевременно на по-ниските

структурно-функционални нива в растителния организъм се наблюдава и известна специфичност, което налага разработването на различни растителни тестове за отделните групи токсиканти.

Тежките метали са една от основните групи замърсители на околната среда. Независимо че част от тях в нормални концентрации са необходими за растенията микроелементи (Cu, Zn), излишъкът им в околната среда често води до фитотоксични проблеми. В определени случаи визуални фитотоксични симптоми могат да не бъдат проявени, но да са налице предизвикани от тежките метали функционални нарушения в растенията, които в крайна сметка водят

до известно понижаване на растежа и продуктивността (Vangronsveld and Clijsters, 1992; Янков и Делибалтова, 2002; Koleva et al., 2009).

Екотоксикологичните изследвания, свързани с тежките метали, най-често се провеждат във връзка с оценка на екологичния риск за естествените фитоценози и на потенциалната фитотоксичност на замърсени земеделски земи. За тази цел се използват ограничен брой растителни тестове, основани на променит е в кълняемостта на семената, натрупването на биомаса, ензимните активности и др. (OECD, 1984; Ап, 2004; Vangronsveld and Clijsters, 1992). Редица фотосинтетични параметри показват висока чувствителност към тежки метали (Vassilev, 2002). Част от тях, като скорост на CO_2 асимилацията и хлорофилната флуоресценция, се измерват бързо и недеструктивно, което ги прави особено подходящи за индикатори в растителни тестове.

На базата на растежни и функционални индикатори, в това число и фотосинтетични параметри, е разработен тест с млади краставични растения, който е пилотно изпитан за оценка на фитотоксичността на замърсени с тежки метали почви (Василев и съавт., 2009). Целта на проведеното изследване е да се сравни чувствителността на разработения тест с референтния тест на Vangronsveld and Clijsters (1992), базиран на реакцията на фасулеви растения. Двата теста класифицират замърсените с тежки метали среди (почви, субстрати) в идентични фитотоксични класове, но се различават по използвания растителен вид и някои функционални индикатори – в теста на Vangronsveld and Clijsters (1992) са включени основно ензимни активности и изоензимен спектър на пероксидазата, а в теста на Василев и съавт. (2009) се използват и недеструктивни фотосинтетични параметри.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Лабораторните опити са проведени с краставични растения (хибрид Левина) и фасулеви растения (сорт *Limburgse vroege*) при контролирани условия на средата в Катедрата по физиология на растенията и биохимия. Растенията от двата растителни вида са отгледани в съдове с перлит, в които ежедневно е внасян S хранителен разтвор на Хогланд с добавка на соли на тежките метали Cd, Zn и Cu. Опитната постановка за всеки растителен вид включва четири варианта, описани по-рано (Василев и съавт., 2009). Накратко, вариантите са: (1) контрола – внасяне само на хранителен разтвор; (2) хранителен разтвор с добавка на водоразтворими форми на Cd, Zn и Cu в концентрации 25 μM Cd, 500 μM Zn и 20 μM Cu (пълна доза); (3) хранителен разтвор с добавка на 1/2 от пълната доза тежки метали (ТМ); (4) хранителен разтвор

с добавка на 1/4 от пълната доза ТМ. Третирането на растенията с ТМ започва от момента на засяването на семената и продължава 3 седмици. В края на опитите са определени стойностите на следните растежни и функционални параметри в растенията: (1) свежа маса и листна площ на растенията – с електронен площомер NEO2 (ТУ, България); (2) скорост на CO_2 асимилацията – с апарата LCA-4 (ADC, England), и скорост на фотосинтетичния електронен транспорт (ETR) – с апарата MINI-PAM (H.Walz, Germany); (3) активност на ензимите гваякол пероксидаза (EC 1.11.1.7) и изоцитрат дехидрогеназа (E.C. 1.1.1.42) по Van Assche et al. (1988). Получените данни са обработени статистически и достоверността на разликите с контролата е преценена по критерия t на Стюдънт.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Използваните в екотоксикологията растителни тестове следва да отговарят на следните общи изисквания: (а) да се провеждат при контролирани условия на средата, за да са възпроизводими; (б) да използват чувствителни към токсикантите растителни видове; (с) да са сравнително бързи за изпълнение; (д) да комбинират морфологични и функционални индикатори на състоянието на растителния организъм. Включените в изследването два растителни теста отговарят на посочените условия.

Тестът на Vangronsveld and Clijsters (1992) използва като индикаторен обект чувствителния към тежки метали сорт фасул *Limburgse vroege*. Основни индикатори на металната фитотоксичност в този тест са степента на понижаване на листната площ и свежата маса на растенията, както и на повишаване активността на ензимите GPOD и ICDH в техните органи. В теста не са включени фотосинтетични индикатори, защото обект на изследване са първичните листа на фасула. Поради миксотрофния си характер на хранене фотосинтетичната активност на тези листа не се повлиява силно от стресови фактори (Vassilev et al., 2007). Тестът на Vangronsveld and Clijsters (1992) създава възможност за класифициране на токсичността на замърсената с тежки метали (ТМ) почва в 4 класа – нетоксична почва (I), слабо (II), умерено (III) и силно токсична почва (IV) (таблица 1). Крайната оценка се получава като средно аритметично от класовете на отделните индикатори.

В теста на Василев и съавт. (2009) се използват краставични растения от хибрида Левина. Индикатори в теста са чувствителните фотосинтетични параметри – скорост на CO_2 асимилацията и скорост на фотосинтетичния електронен транспорт (таблица 2). Освен растежните показатели листна площ и свежа маса на растенията в теста е включен и показателят GPOD в корените, който е особено показателен при ниска фитотоксичност на субстрата. Краставиците са избрани

Таблица 1. Основни параметри и стойности за класифициране на токсичността на замърсени с тежки метали почви в теста с фасулеви растения на Vangronsveld and Clijsters (1992). Стойностите на параметрите в теста за отделните токсични класове са посочени в процент от контролата

Table 1. Main parameters and values for toxicity classification of heavy metal contaminated soil in the bean test of Vangronsveld and Clijsters (1992). The values of the parameters in the test for the definitive toxicity classes are shown in percent from the controls

Параметър Parameters	Токсичност на кореновата среда / Root medium toxicity			
	Нетоксична Nontoxic (клас 1/class 1)	Слабо токсична Slightly toxic (клас 2/class 2)	Умерено токсична Moderately toxic (клас 3/class 3)	Силно токсична Strongly toxic (клас 4/class 4)
Площ на листата Leaf area	> 85	85-70	70-50	< 50
Свежа маса Fresh weight	> 85	85-70	70-50	< 50
GPOD листа/leaves	< 150	150-325	325-500	> 500
ICDH листа/leaves	< 125	125-175	175-250	> 250
GPOD корени/roots	< 125	125-175	175-250	> 250
ICDH корени/roots	< 125	125-175	175-250	> 250

Таблица 2. Основни параметри и стойности за класифициране на токсичността на замърсени с тежки метали почви в теста с краставични растения на Василев и съавт. (2009). Стойностите на параметрите в теста за отделните токсични класове са посочени в % от контролата

Table 2. Main parameters and values for toxicity classification of heavy metal contaminated soil in the cucumber test of Vassilev et al. (2009). The values of the parameters in the test for the definitive toxicity classes are shown in percent from the controls

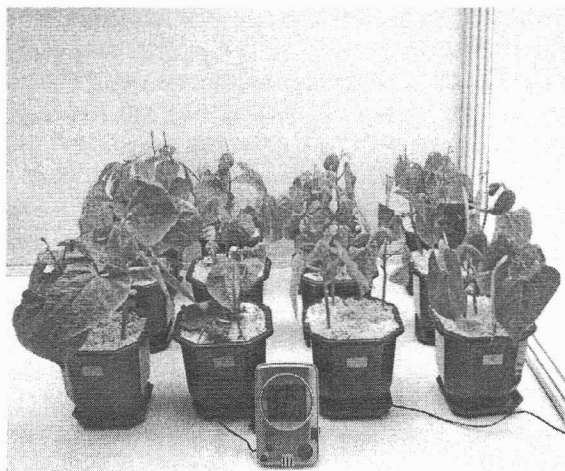
Параметри Parameters	Токсичност на кореновата среда / Root medium toxicity				
	Нетоксична Клас I/class 1	Слабо токсична Slightly toxic (клас 2/class 2)	Умерено токсична Moderately toxic (клас 3/class 3)	Силно токсична Strongly toxic (клас 4/class 4)	Летална Lethal клас 5 class 5
Свежа маса/ Fresh weight	> 90	85-75	75-40	< 40	Без поникване
Листна площ/ Leaf area	> 90	85-75	75-40	< 40	No germination
Скорост на фс/ Photosynthetic rate	95-105	> 70	70-40	< 40	-
ETR	95-105	> 80	80-50	< 50	-
GPOD корени/roots	100-125	125-150	150-200	> 200	-

за тестова култура, защото имат относително бърза скорост на растеж и висока транспирация, която води до по-значителен транспорт на тежки метали към надземните органи и съответно до по-силно инхибиране на фотосинтетичните параметри (Николова и съавт., 2006; Vassilev et al., 2007). Тестът създава възможност за класифициране на токсичността на почвата в 5 класа, като в него за разлика от теста на Vangronsveld and Clijsters (1992) е включен и V клас - летална почва, в която растения не се развиват. Стойностите на растежните показатели за отделните фитотоксични класове в двата теста са идентични.

Резултатите от проведеното сравнително изследване между двата растителни теста са отразени в таблица 3 и таблица 4, а външният вид на краставичните и фасулевите растения е показан на фигура 1a, b. Вижда се, че при краставичните растения от вариант 3 (1/2 доза ТМ) и вариант 4 (пълна доза ТМ) са налице силно изразени признаци на хлороза, които отсъстват при идентичните варианти с фасулеви растения. От друга страна, при фасулевите растения се наблюдава увяхване и частично опадване на първичните листа, което е индикатор на нарушен водообмен и ускорено стареене на листата. Липсата на



a



b

Фиг. 1а, б. Външен вид на краставичните (а) и на фасулевите (б) растения, отглеждани в среди с нарастващо съдържание на Cd, Zn и Cu. Отляво надясно: вариант 1 (контрола), вариант 4 (пълна доза ТМ), вариант 3 (1/2 доза ТМ), вариант 2 (1/4 доза ТМ)

Fig. 1a, b. View of cucumber and bean plants grown in media with increasing content of Cd, Zn and Cu. From left to right: treatment 1 (control), treatment 4 (full dose HM), treatment 3 (1/2 of full dose HM) and treatment 2 (1/4 of full dose HM)

Таблица 3. Растежни и функционални параметри на фасулеви растения, отглеждани в среди с нарастващо съдържание на Cd, Zn и Cu. FW – свежа маса (g); LA – листна площ (cm²); A – скорост на нето фотосинтезата (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); GPOD – гваякол пероксидазна, и ICDH – изоцитрат дехидрогеназна активност (mU g⁻¹ свежа маса)

Table 3. Growth and functional parameters of bean plants grown in media with increasing content of Cd, Zn and Cu. FW – fresh mass (g); LA – leaf area (cm²); A – net photosynthetic rate (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); GPOD - guijacol peroxidase and ICDH isocitrate dehydrogenase activity (mU g⁻¹ FW)

Параметри Parameters	Варианти / Treatments			
	Контрола (без ТМ) Control (without HM)	1/4 доза ТМ 1/4 dose HM	1/2 доза ТМ 1/2 dose HM	Пълна доза ТМ Full dose HM
FW	7.40 (100)	7.05 (95)	5.80* (78)	4.07* (55)
LA	162 (100)	128* (79)	92* (57)	81* (50)
GPOD листа/ leaves	812 (100)	924 (114)	1187*(146)	1350* (166)
ICDH листа/ leaves	432 (100)	467 (108)	515 (119)	569* (132)
GPOD корени/ roots	3410 (100)	4320* (127)	4711* (138)	5812* (170)
ICDH корени/ roots	348 (100)	415* (120)	428* (123)	461* (132)
Фитотоксичен клас/ Phytotoxicity class	-	I	II	III

*Разликите с контролата са доказани при P = 0,05.

*Differences between the treatments and the control values are significant at P = 0.05.

Таблица 4. Растежни и функционални параметри на краставични растения, отглеждани в среди с нарастващо съдържание на Cd, Zn и Cu. FW – свежа маса (g); LA – листна площ (cm²); A – скорост на нето фотосинтезата (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); ETR – скорост на действителния електронен транспорт (μmol m⁻² s⁻¹); GPOD – гваякол пероксидазна активност в корените (mU g⁻¹ свежа маса)

Table 4. Growth and functional parameters in cucumber plants grown in media with increasing content of Cd, Zn and Cu. FW – fresh mass (g); LA – leaf area (cm²); A – net photosynthetic rate (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); ETR – apparent photosynthetic transport rate (μmol m⁻² s⁻¹); GPOD - guijacol peroxidase activity in roots (mU g⁻¹ FW)

Параметри Parameters	Варианти/Treatments			
	Контрола (без ТМ) Control (without HM)	1/4 доза ТМ 1/4 dose HM	1/2 доза ТМ 1/2 dose HM	Пълна доза ТМ Full dose HM
FW	5.27 (100)	4.01* (76)	2.87* (54)	2.15* (41)
LA	103.5 (100)	81.0* (78)	70.5* (68)	40.0* (39)
A	13.15 (100)	9.47* (72)	4.78* (36)	2.95* (22)
ETR	36.7 (100)	29.5* (80)	19.8* (54)	11.9* (32)
GPOD корени/ roots	3128 (100)	4123* (131)	5619* (180)	7115* (228)
Фитотоксичен клас/ Phytotoxicity class	-	II	III	IV

*Разликите с контролата са доказани при P = 0,05.

*Differences between the treatments and the control values are significant at P = 0.05.

видими промени в пигментното съдържание на първичните листа на фасула потвърждава мнението, че фотосинтетичната активност на първичните листа не е високочувствителна към метален стрес.

Резултатите показват, че излишъкът на ТМ в средата потиска растежа на тестовите растения. С изключение на варианта с 1/4 доза ТМ при фасулевия тест (таблица 3) свежата маса и листната площ на фасулевите и краставичните растения намаляват съществено при ясно изразена отрицателна зависимост от дозата на приложените ТМ.

Нарасналата активност на GPOD в органите на фасулевите растения показва, че растенията изпитват окислителен стрес, при който се активират НАДФ-редуциращи ензими като ICDH. Съгласно с нормираните стойности в теста на Vangronsveld and Clijsters (1992) степента на индукция на посочените ензими в органите на фасулевите растения е относително по-малка от инхибирането на растежните процеси. Интегралната оценка на токсичността на замърсените с ТМ субстрати е, както следва: 1/4 доза ТМ – слабо токсична (I клас); 1/2 доза ТМ – слабо токсична (II клас); пълна доза ТМ - умерено токсична (IV клас).

Резултатите в таблица 4 показват, че инхибицията на растежа на краставичните растения е съпроводена от силно потискане на фотосинтетичната активност на листата. Във варианта с пълна доза ТМ скоростта на CO₂ асимилацията представлява 22% от тази в контролните растения. Това се дължи на дълбоки структурно-функционални увреждания, сред които са визуално намаленото съдържание на фотосинтетични пигменти, както и драстично понижената скорост на фотосинтетичния електронен транспорт – с 68%. С увеличаване на дозата на ТМ растежът и фотосинтетичната активност на растенията прогресивно намаляват и нараства активността на антиокислителните ензими (GPOD). Интегралната оценка на замърсените с ТМ субстрати съгласно с използвания тест на Василев и съавт. (2009) е следната: 1/4 доза ТМ – слабо токсичност (II клас); 1/2 доза ТМ – умерена токсичност (III клас); пълна доза ТМ – силна токсична (IV клас).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Използваните растителни тестове отразяват адекватно фитотоксичността на замърсените с ТМ перлитни субстрати. Тестът на Василев и съавт. (2009)

с краставични растения показва по-висока чувствителност от теста на Vangronsveld and Clijsters (1992) с фасулеви растения, тъй като идентифицира по-висока токсичност (II – IV клас) на анализираниите субстрати. От друга страна, силно негово предимство е бързината на измерване на неструктурните фотосинтетични параметри – скорост на CO₂ асимилацията и скорост на фотосинтетичния електронен транспорт.

ЛИТЕРАТУРА

- Василев, А., М. Берова, Н. Стоева, З. Златев**, 2009. Разработване и пилотно изпитване на растителен тест за оценка на токсичността на замърсени с тежки метали почви. – *Аграрни науки*, 1, 45-53.
- Николова, А., Л. Колева, А. Василев**, 2006. Структурно-функционално изследване на фотосинтетичния апарат на краставични растения (*Cucumis sativus*) в условия на излишък от тежки метали. – В: *Научни трудове на Аграрния университет*, т. LI, 13-16.
- Янков, Б., В. Делибалтова**, 2002. Отглеждане на памук в условия на атмосферно и почвено замърсяване с тежки метали. – В: *Научни трудове на Аграрния университет - Пловдив*, том XLVII, 1, 303-308.
- Al, Y. J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. – *Environm. Poll.*, 127: 21-26.
- Hock, B., E. Elstner, 2005. Preface. – In: *Plant Toxicology* (Hock, B., E. Elstner, Eds.) Fourth Edition. Marcel Dekker, New York.
- Lewis, M. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. – *Environm. Poll.*, 87: 319-336.
- Organisation for Economic Cooperation and Development - OECD*, 1984. Terrestrial plants, growth test, OECD - 208. – Paris.
- Koleva, L., D. Staneva, I. Yordanova, T. Vineva, A. Vassilev, 2008. Cultivar differences in Cd, Zn and Pb

- accumulation and productivity of durum wheat plants grown in metal contaminated soils. – In: *Proceedings of submitted papers of the 8th International Conference on Food Physics and Physical Chemistry of Food*, 24-27 September, Plovdiv, Bulgaria, pp. 112-119.
- Smith, B., 1978. An inter- and intra-agency survey of the use of plants for toxicity assessment. – In: J. Gorsuch, W. Lower, W. Wang, M. Lewis (Editors), *Plants for toxicity assessment*, vol. 2, ASTM STP 1115, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1978, pp. 41-59.
- Vangronsveld, J., H. Clijsters, 1992. A biological test system for the evaluation of metal phytotoxicity and immobilisation by additives in metal contaminated soils. – In: E. Merian and W. Haedi (Editors), *Metal compounds in environment and life*, 4. Special supplement to *Chemical Speciation and Bioavailability*, Wilmington: Science Reviews Inc., 1992, pp. 117-125.
- Vassilev, A., 2002. Use of chlorophyll fluorescence for phytotoxicity testing. – *J. Environm. Protection and Ecology*, 3 (4): 901-912.
- Vassilev, A., L. Koleva, M. Berova, N. Stoeva, 2007. Development of a plant test system for metal toxicity evaluation. I. Sensitivity of plant species to heavy metal stress. – *J. Central European Agriculture*, 8 (2), 135-140.
- Van Assche, F., C. Cardinaels, H. Clijsters, 1988. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium. – *Environm. Poll.*, 52, 103-115.

**Статията е приета на 30.03.2010 г.
Рецензент – доц. д-р Стефан Шилев
E-mail: stefan.shilev@au-plovdiv.bg**