

**МЕТАЛНА ФИТОТОКСИЧНОСТ – ПОДХОДЯЩИ ИНДИКАТОРИ И ТЕСТОВЕ ЗА ЕКОТОКСИКОЛОГИЧНА
ОЦЕНКА НА ЗАМЪРСЕНИ ПОЧВИ
METAL PHYTOTOXICITY: SUITABLE INDICATORS AND TESTS FOR ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF
CONTAMINATED SOILS**

**Андон Василев^{1*}, Малгожата Берова¹, Невена Стоева¹, Златко Златев¹, Николай Динев²
Andon Vassilev^{1*}, Malgozata Berova¹, Nevena Stoeva¹, Zlatko Zlatev¹, Nikolay Dinev²**

¹Аграрен университет – Пловдив

²Институт по почвознание “Никола Пушкарров”, София

¹Agricultural University of Plovdiv

²Soil Science Institute “Nickola Pushkarov”, Sofia

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

Резюме

Металната фитотоксичност е проблем в част от замърсените с тежки метали почви. Визуални нейни симптоми са неспецифични хлорози и некрози в органите на растенията. Предизвиканите от тежките метали структурно-функционални нарушения водят до потискане на растежа и до понижаване на растителната продуктивност. За оценка на биологичното качество на замърсените почви се използват биотестове, в това число и растителни тестове. В настоящия обзор е показано, че редица физиологични показатели, като скорост на растежа, активност на антиокислителни ензими, количество на фотосинтетичните пигменти, скорост на фотосинтезата и други, имат висока чувствителност към тежките метали и могат да бъдат използвани като индикатори на метална фитотоксичност. Представени са резултати, свързани с разработването на тест с краставични растения и неговото приложение за оценка на фитотоксичността на замърсени с тежки метали почви.

Abstract

Metal phytotoxicity is a topical problem in a part of soils contaminated by heavy metals. Nonspecific chlorosis and necrosis are visual toxicity symptoms in plant organs. Heavy metal-induced structural-functional disorders lead to growth retardation and decreased plant productivity. The biological quality of the contaminated soils is evaluated through biotests, including phytotests. In the present review-paper it is shown that a number of physiological parameters, such as growth rate, antioxidative enzyme activities, photosynthetic pigments content, etc. have high sensitivity to heavy metals and may be used as indicators of metal phytotoxicity. Data concerning both the development of a new test with cucumber plants and its application for evaluation of phytotoxicity of metal-contaminated soils are presented.

Ключови думи: тежки метали, растителни тестове, фитотоксичност, растеж, фотосинтеза.

Key words: heavy metals, plant tests, phytotoxicity, growth, photosynthesis.

УВОД

Замърсяването на почвите с тежки метали (ТМ) е актуален екологичен проблем. Освен потенциална опасност за здравето на хората ТМ често предизвикват прояви на метална фитотоксичност, които потискат растежа и намаляват продуктивността на растенията. В този аспект ТМ в определени случаи са стресов фактор за растенията. Процесите на естествено очистване на почвите от ТМ продължават хиляди години, поради което замърсените почви носят постоянен риск за здравето на хората и устойчивото

функциониране на екосистемите (McGrath, 1987). Това провокира интерес към разработване на технологии за безопасно и рационално използване на замърсените с ТМ почви.

Изборът на технология зависи от степента на здравния риск и фитотоксичността на замърсената с ТМ почва. При оценка на потенциалната биотоксичност на замърсената почва наред със стандартните химични и физични методи се използват и биотестове с животински видове, микроорганизми и растения (Adriano, 2001). Използването на растителни тестове за

оценка на фитотоксичността на замърсената с ТМ почва се налага поради факта, че общата концентрация на отделните ТМ в почвата не дава представа за тяхната подвижност, достъпност и биотоксичност (Vangronsveld and Clijsters, 1992). Освен това в преобладаващия брой случаи почвите са замърсени с комплекс от ТМ и следователно тяхната токсичност може да бъде резултат както на действието на един конкретен метал, така и на взаимодействията между тях – синергитични, антагонистични или адитивни.

Преценката за фитотоксичността на замърсените с ТМ почви често се прави индиректно, на базата на намаляването на добивите в сравнение с тези в близки, незамърсени райони. Стандартизираните растителни тестове за коректно определяне на фитотоксичността на замърсени с ТМ почви са сравнително малко на брой. Като индикатори на фитотоксичността в повечето тестове се използват покълването на семената, биометрични параметри на растенията, активността на стрес-чувствителни ензими и др. (OECD, 1984; An, 2004; Vangronsveld and Clijsters, 1992). Един от най-използваните растителни тестове е фасулевият тест на Vangronsveld and Clijsters (1992), в който основни индикатори са листната площ и свежата маса на растенията, активността на стресови ензими и изоензимния спектър на гваякол пероксидазата.

Съвременната физиологична наука предлага достатъчно други чувствителни индикатори на метална фитотоксичност, които могат да бъдат използвани в растителни тестове. За интегриране на индикаторите в такива тестове са необходими допълнителни изследвания, свързани с (1) подбора на тестовите растения, (2) условията на тяхното отглеждане, (3) класифицирането на проявената метална фитотоксичност, както и (4) пилотното приложение на растителните тестове за оценка за замърсени с ТМ почви. Изследвания в този аспект се провеждат в Катедрата по физиология на растенията и биохимия в Аграрния университет – Пловдив през последните няколко години (Vassilev et al., 2007; Василев и съавт., 2009; Василев и Николова, 2010). В настоящия обзор накратко са представени част от тези изследвания.

Индикатори на метална фитотоксичност

Негативното влияние на ТМ върху растенията е интегрален резултат от взаимодействията им с много биологични процеси, протичащи на различни структурно-функционални нива. Поради системите за саморегулация, обаче, проявите на токсичност на по-ниските нива невинаги могат да бъдат изявени на по-високите нива. В тази връзка е необходимо растителните тестове да включват индикатори на нарушенията от различни нива и характер.

На клетъчно ниво подходящи индикатори на металната фитотоксичност са промените в антиоксидителната защитна система на клетката и структурно-функционалното състояние на мембраните. Независимо че част от ТМ имат нисък редокс-потенциал и не могат да участват в окислително-редукционни процеси (Cd, Zn, Pb), редица изследвания показват, че всички проблемни ТМ могат да предизвикат растителни отговори към окислителен стрес (Milone et al., 2003; Vassilev et al., 2004b). Най-общо окислителният стрес е такова състояние на клетките, при което продукцията на свободните радикали (супероксиден радикал $\cdot\text{O}_2$, хидроксилен радикал $\cdot\text{OH}$) и активните кислородни видове (синглетен кислород $^1\text{O}_2$, водороден пероксид H_2O_2) нараства над "нормалните" нива.

По принцип клетката разполага с механизми за защита от окислителен стрес, които функционират интегрирано като антиоксидителна защитна система, включваща ензимни и неензимни компоненти. В нея са включени ензимите супероксидна дисмутаза (SOD; EC 1.15.1.1), пероксидаза (POD; EC 1.11.1.7), каталаза (CAT; EC 1.11.1.6), метаболитите (глутатион, аскорбат) и ензимите от аскорбат-глутатионовия цикъл, както и други антиоксиданти като каротеноиди и полиамини.

Най-общо клетъчният отговор към окислителен стрес е свързан с промени в активностите на антиоксидителните ензими, редокс-състоянието и количеството на неензимните антиоксиданти (Cuypers et al., 2001). По принцип в началото на стресовия отговор се наблюдава индукция (повишение) в активността на антиоксидителните ензими, която може да се свърже както с тяхната активация, така и с *de novo* белтъчен синтез (Clijsters et al., 1999). Наред с посочените ензими се повишава и активността на НАД(Ф)⁺ редуциращи ензими (например изоцитрат дехидрогеназа, глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа, малик ензима), което се обяснява с недостиг на редуциращи еквиваленти при стресово състояние. При достигане на определени критични концентрации на ТМ в клетките активността на посочените ензими може да бъде инхибирана. Kono and Fridovich (1982) установяват силно инхибиране на каталазната активност от $\cdot\text{O}_2$ радикал, а Casano et al. (1997) - фрагментиране на Cu-Zn-SOD от $\cdot\text{OH}$ радикал.

Инхибирането на антиоксидителните ензими и намаляването на неензимните антиоксиданти води до неконтролируемо нарастване на продукцията на свободни радикали и активни кислородни видове в клетките. Това предизвиква окисляване на важни макромолекули, в това число и ненаситените мастни киселини в липидните компоненти на мембранните системи, при което се нарушава техният интегритет и функционална активност. В резултат на тези нарушения



нараства изтичането на електролити във външната среда. Деграцията на ненаситените хидропероксилирани мастни киселини в подложените на метален стрес растения води до нарастване на емисиите на крайните им продукти - етан и етилен (Lidon and Henriques, 1993; Baryla et al., 2001; Vassilev et al., 2004). Мултипликацията на посочените негативни ефекти на ТМ върху основните физиологични процеси води до различни структурно-функционални нарушения в растителния организъм, обединени под общото наименование *метална фитотоксичност*.

На организмово ниво индикатори на металната фитотоксичност са растежните параметри и визуалните признаци на токсичност (хлорози и некрози по листата, покафеняване на кореновата система и др.). Растежът е интегрален физиологичен процес, чиито параметри (свежа и суха маса, листна площ, височина, дължина на корените и др.) лесно могат да бъдат измерени. Някои растежни параметри, като дължина на корените и относителна скорост на растежа (RGR), са достатъчно чувствителни към излишък на ТМ (Woolhouse, 1983; Ernst et al., 1992). При хронично въздействие с ТМ визуалните токсични признаци може да бъдат по-малко изявиени или напълно да отсъстват, но RGR винаги намалява (Vangronsveld and Clijsters, 1992).

Редуктивният анализ на факторите, ограничаващи растежа на третираните с ТМ растения (Vassilev and Yordanov, 1997), показва, че най-често това са нарушенията във фотосинтетичния процес. Обяснението на този факт се свързва с редица негативни ефекти на ТМ върху отделни звена на интегралния процес. Тежките метали ограничават дифузията на CO_2 през устицата, инхибират хлорофилната биосинтеза, намаляват фотосинтетичния електронен транспорт и потискат биохимичните процеси от цикъла на Калвин (Krupa and Baszynski, 1995). От друга страна, много негативни ефекти на ТМ върху други физиологични процеси в крайна сметка рефлектират върху фотосинтетичния процес (Barcelo and Poschenrieder, 1990; Van Asshe and Clijsters, 1990). Всичко това прави функционалната активност на фотосинтетичния апарат обективен индикатор на прояви на метална фитотоксичност.

Листният газов обмен (скорост на фотосинтезата, интензивност на транспирацията, устична проводимост и др.) е подходящ индикатор за нарушенията на органно ниво главно поради бързината на измерване в интактни листа и високата чувствителност. Тежките метали нарушават процесите на водообмена, което води до промени в устичната проводимост (Barcelo and Poschenrieder, 1990), и съответно до нарастване на устичното лимитиране на фотосинтезата (Vassilev et al., 2002). В някои случаи, обаче, тенденцията е различна поради промени в

донорно-акцепторните отношения в растенията. Например при слаба метална фитотоксичност (или начало на метален стрес) растежът на корените може да бъде потиснат, без да се регистрира съществена промяна в растежа на надземните органи. В този случай временният излишък на въглехидрати в листата повишава осмотичното налягане на затварящите клетки, в резултат на което устичната проводимост и интензивността на транспирацията се повишават (Barcelo and Poschenrieder, 1990). Това обикновено е съпроводено с промени в специфичната плътност на листата - сухата маса в единица листна площ (Vassilev et al., 1998), което може да доведе до отчитане на повишена скорост на фотосинтезата, при положение че тя се изразява на единица листна площ (Merakchijska and Yordanov, 1983; Landberg and Greger, 1994). В преобладаващия брой случаи, обаче, скоростта на фотосинтезата намалява поради съвместното негативно влияние на устични и мезофилни фактори.

Фотосинтетичните пигменти се считат за чувствително звено на токсичните метални ефекти (Krupa and Baszynski, 1995) главно поради характерните прояви на хлороза в изпитващите метален стрес растения. От друга страна, те често са включвани в различни фитотоксични тестове поради сравнително лесното им определяне (Lewis, 1995). Съвременните представи за негативното влияние на ТМ върху фотосинтетичните пигменти се свързват с: инхибиране на тяхната биосинтеза (Stobart et al., 1985); индуциране на Fe и Mg дефицит (Greger and Limberg, 1987); заместване на Mg в хлорофилната молекула с йон на ТМ (Kyrper et al., 1998); окислително разграждане (Somashekaraiyah et al., 1992; Lidon and Henriques, 1992a), както и намаляване на средния брой на хлоропластите в клетката (Baryla et al., 2001).

Основните мезофилни лимитации на фотосинтезата в третираните с ТМ растения са свързани с биохимичните процеси от цикъла на Калвин и фотосинтетичния електронен транспорт. Известно е, че ТМ могат да инхибират или напълно да инактивират активността на основния фотосинтетичен ензим рибулозобисфосфат карбоксилаза/оксигеназа (*Rubisco*) (Stiborova et al., 1988; Kamenova-Jouhimenko et al., 1997/98) и да предизвикват редица нарушения в електронно-транспортните процеси, свързани с ФС2 и ФС1 (Tukendorf and Baszynski, 1991; Vassilev et al., 2003). Нарушенията във фотосинтетичния електронен транспорт се дължат на ултраструктурни нарушения в тилакоидите (Baszynski, 1986; Stoyanova and Merakchiyska-Nikolova, 1991), на намаляване на нивата на електронните преносители (Lidon and Henriques, 1992b), на инхибиране на фотоактивацията на ФС2 (Faller et al., 2005) и редица други негативни ефекти на ТМ.

Хлорофилната флуоресценция намира широко приложение в еколого-физиологичните изследвания като показател на стреса при растенията, в това число и при метален стрес (Krupa and Baszynski, 1995; Vassilev et al., 2003). Някои флуоресцентни параметри, определени с модулиращи системи, дават възможност за определяне на действителната скорост на фотосинтетичния електронен транспорт около ФС2 (ETR) като функция от добива на конвертирана фотохимична енергия (Y) и интензивността на светлината (White and Critchley, 1999). Vassilev and Manolov (1999) установяват, че чувствителността на действителната ETR към Cd стрес е висока и се повишава значително, ако се определя във функционален режим чрез снемане на така наречените "бързи светлинни криви" (White and Critchley, 1999).

Нов тест за оценка на фитотоксичността на замърсени с тежки метали почви

През последните години интересът към използване на растителни тестове в екоотоксикологични изследвания нараства. 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 това число и ТМ, в сравнение с други биологични организми (Smith, 1978; Lewis, 1995; Hock and Elstner, 2005). Същевременно стандартизираните растителни тестове са ограничен брой. В тази връзка в рамките на научноизследователски проект, финансиран от Фонд "Научни изследвания", беше разработен нов тест за оценка на метална фитотоксичност на замърсени с ТМ почви и субстрати (Василев и колектив, договор ВУ-АН-3/2005).

Изследванията бяха проведени при контролирани условия на средата, в климатични боксове. Те започнаха със сравняване на чувствителността на няколко култури (царевица, салатата, фасул и краставици) към комплексно замърсяване на средата с Cd, Zn и Cu. Проучени бяха структурно-функционални особености в реакцията на културите към стрес от ТМ. В изследванията се установи, че фасулът и салатите имат различна анатомична реакция на листата към излишък на ТМ в кореновата среда. Третирането с ТМ предизвиква ксероморфни анатомични промени в листата на салатените растения, докато при фасулевите растения е налице обратна тенденция към увеличаване на дебелината на листната петура (Николова и Василев, 2009).

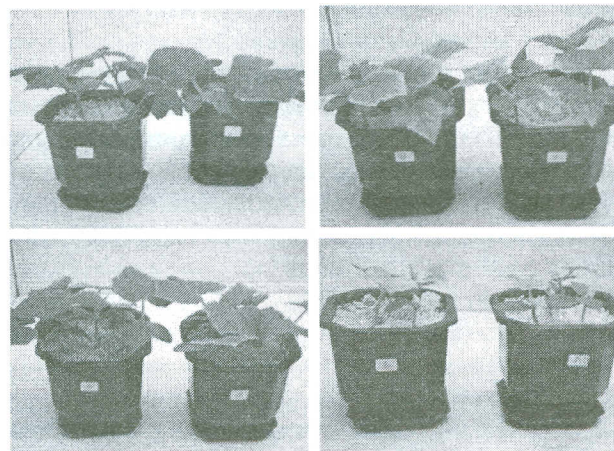
На базата на детайлни анатомични и физиологични изследвания се установи, че най-чувствителни към приложения метален стрес са краставичните растения (Колева и съавт., 2006;

Николова и съавт., 2006; Vassilev et al., 2007). Общият вид на растенията от тези опити е показан на снимки 1 и 2. Висока чувствителност към метален стрес показаха растежните параметри, активността на гваякол пероксидазата в корените, както и количеството на фотосинтетичните пигменти, скоростта на CO₂ фиксацията и скоростта на фотосинтетичния електронен поток – ETR.

Краставицата беше определена като много подходяща за този тест култура и поради следните



Снимка 1. Общ вид на опитите с краставични растения. Отляво надясно: контрола, ¼ доза ТМ, ½ доза ТМ, пълна доза ТМ; пълна доза - 25 μM Cd, 20 μM Cu и 500 μM Zn
Picture 1. General view of the experiments with cucumber plants. From left to right: control; ¼ dose HM, ½ dose HM, full dose HM. The full dose contains - 25 μM Cd, 20 μM Cu and 500 μM Zn



Снимка 2. Общ вид на опитите с краставични растения. Горѐ вляво: контрола; горѐ вдясно - ¼ доза ТМ; долу вляво - ½ доза ТМ; долу вдясно - пълна доза ТМ
Picture 2. General view of the experiments with cucumber plants. Up-left: control, up-right - ¼ dose HM, down-left - ½ dose HM, down-right - full dose HM



причини: (а) има относително бърза скорост на поникване и растеж, което намалява продължителността на теста; (б) има висока транспирация, която води до по-значителен транспорт на ТМ към надземните органи и съответно до по-силно инхибиране на фотосинтетичните параметри; (с) има относително малък миксотрофен период на хранене, което създава възможност за по-ранна диагностика на ефекта на металния стрес.

Растителните тестове класифицират фитотоксичността на субстрата в различни групи (класове). В теста на Vangronsveld and Clijsters (1992) се използват следните фитотоксични класове: нетоксична (I клас), слабо токсична (II клас), умерено токсична (III клас) и силно токсична (IV клас). За определяне на количествените параметри на избраните индикатори в новия тест с краставични растения бяха проведени допълнителни опити с нарастващи концентрации на ТМ в средата (Василев и съавт., 2009). В резултат на тези опити бяха нормирани 5 фитотоксични класа, като в допълнение към посочените беше включен и V клас – летална почва или субстрат (таблица 1).

За да проверим чувствителността на разработения тест, бяха проведени сравнителни изследвания на новия тест с теста на Vangronsveld and Clijsters (1992) (Василев и Николова, 2010). Установено

беше, че тестът с краставични растения има по-висока чувствителност към метална токсичност в сравнение с теста с фасулеви растения, тъй като идентифицира по-висока токсичност на анализирани субстрати. В допълнение силно негово предимство е бързината на измерване на неструктурните фотосинтетични параметри.

Екотоксикологична оценка на замърсени с тежки метали почви

Разработеният нов тест беше приложен за оценка на фитотоксичността на замърсени с ТМ почви в района на медодобивното предприятие Кумерио край гр. Златица. Подборът на пробите беше извършен на базата на данни за общото съдържание на ТМ в почвата и реакцията на средата от мониторингови мрежи, използвани в изследователската работа на д-р Николай Динев (таблица 2). За контроли бяха използвани почвени проби, взети от най-далечна дистанция от замърсения район със съдържание на ТМ под установените у нас ПДК. За изравняване на евентуални разлики в минералния фон всички почвени проби във всеки опит бяха полети двукратно с еднакъв обем хранителен разтвор на Хогланд.

Данните от таблица 2 потвърдиха, че с малки изключения основното почвено замърсяване е от

Таблица 1. Стойности на индикаторите в теста с краставични растения за отделните фитотоксични класове (в % от контролата)

Table 1. Values of indicators in the test with cucumber plants for the different phytotoxicity classes (in % from the control)

Параметри/ Parameters	Фитотоксични класове / Phytotoxicity classes				
	Нетоксична Клас I Nontoxic, Class I	Слабо токсична Клас II Slightly toxic, Class II	Умерено токсична Клас III Moderately toxic, Class III	Силно токсична Клас IV Strongly toxic, Class IV	Летална Клас V Lethal, Class V
Свежа маса/ Листна площ Fresh mass/ Leaf area	> 90	85-75	75-40	< 40	Няма поникване No germination
Скорост на ФС/ Net photosynthetic rate	95-110	>70	70-40	< 40	-
ETR	95-105	>80	80-50	< 50	-
GPOD корени/ GPOD roots	100-125	125-150	150-200	> 200	-

Таблица 2. Общо съдържание на тежки метали (mg/kg) и реакция на средата в подбрани почвени проби от района около Златица

Table 2. Total content of heavy metals (mg/kg) and soil reaction in selected soil samples, taken in the region around Zlatitsa

Варианти Variants	pH	Cd	Cu	Pb	Zn
1	5.2	<1.0	1900	67	87
2	5.5	<1.0	2087	26	109
3	7.3	<1.0	710	144	178
4	5.7	<1.0	112	150	212
5	6.5	<1.0	59	28	57
6	6.4	<1.0	67	48	87



Снимка 3. Общ вид на опитите с почвени проби от района на Златица

Picture 3. General view of the experiments with soil samples from Zlatitsa region

тежкия метал Cu. При стойност на ПДК от 80 mg/kg почва (при pH<6,0) вариантите 1 и 2 имат съдържание на Cu съответно 1700 и 2087. Пробите от опорни точки в съседство с пътища имат и силно завишени стойности на Pb. До 5 км източно от предприятието Кумерио (вариант 3) стойностите на Cu са над установените ПДК.

Общият вид на растенията от проведените опити е представен на снимки 3, а резултатите са отразени в таблица 3. В почвената проба от вариант 1 растенията не поникнаха, а тези от вариант 2 се отличаваха със силно инхибиран растеж. Очевидно високата фитотоксичност се дължи на тежкия метал Cu, който поради редоксактивния си характер е силно токсичен. Леталната фитотоксичност във вариант 1 при по-ниско общо съдържание на Cu в сравнение с тази от вариант 2 може да се обясни с по-киселата реакция,

Таблица 3. Стойности на индикаторите в краставични растения, отглеждани върху замърсени с тежки метали почвени проби от района на Златица. Свежа маса на растенията (g); листна площ (cm²); скорост на нето фотосинтезата (μmol CO₂ m⁻²s⁻¹); ETR (скорост на фотосинтетичния електронен транспорт - μmol m⁻² s⁻¹); гваякол-пероксидазна активност (GPOD - mU g⁻¹ свежа маса)

Table 3. Values of indicators in cucumbeber plants grown in heavy metal contaminated soil samples from Zlatitsa region. Fresh mass of plant (g); Leaf area (cm²); Net photosynthetic rate (μmol CO₂ m⁻²s⁻¹); ETR – apparent photosynthetic transport rate (μmol m⁻²s⁻¹); Gujjacol peroxidase activity in roots (GPOD – mU g⁻¹ FW)

Параметри Parameters	Варианти					
	Вариант 1 Treatment 1	Вариант 2 Treatment 2	Вариант 3 Treatment 3	Вариант 4 Treatment 4	Вариант 5 Treatment 5	Вариант 6 (контрола) Treatment 6 (control)
Свежа маса Fresh mass	No germination	2.15*	4.45	5.07	5.12	4.90
Листна площ Leaf area	-	38.3*	68.2*	87.8	91.5	86.9
Скорост на ФС Photosynthetic rate	-	3.12*	9.15*	10.35	12.11	11.23
ETR	-	12.7*	23.1*	26.1	29.5	28.5
GPOD корени GPOD roots	-	4560*	3215*	2615	2570	2410
Фитотоксичен клас Phytotoxicity class	V	IV	II	I	I	I

*Разликите с контролата са доказани при P = 0.05

*Significant differences with control at P = 0.05



при която достъпните количества на тежкия метал могат да бъдат по-значителни. Почвата от вариант 3 беше характеризирана като слабо токсична. Останалите проби (вариант 4 и 5) не показаха фитотоксични прояви. Получените резултати дадоха основание да се заключи, че разработеният тест показва висока чувствителност към метална фитотоксичност и може да бъде препоръчан за използване за практически цели.

ЛИТЕРАТУРА

- Василев, А., М. БEROVA, 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 :45-52.
- Николова, А., А. Василев, 2009. Структурно-функционални промени в листата на *Lactuca sativa* L. и *Phaseolus vulgare* L. при нарастване на нивата на тежки метали в кореновата среда. – Аграрни науки, 1:33-39.
- Василев, А., А. Николова, 2010. Сравнително изследване върху чувствителността на два растителни теста за оценка на метална фитотоксичност. – Аграрни науки, 3: 27-32.
- Колева, Л., А. Николова, А. Василев, 2006. Физиологична реакция на краставици (*Cucumis sativus*) към нарастващи нива на тежки метали в средата. – Научни трудове на Аграрния университет, т. LI, 9-12.
- 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. – Научни трудове на Аграрния университет, т. LI, 13-16.
- Ан, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. – Environmental Pollution, 127: 21-26.
- Adriano, D. C., 2001. Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. 2nd edition. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Barcelo, J., Ch. Poschenrieder, 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. – J. Plant Nutrition, 13 (1): 1-37.
- Baryla, A., P. Carrier, F. Franck, C. Coulomb, C. Sahut, M. Havaux, 2001. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. – Planta, 212: 696-709.
- Baszynski, T., 1986. Interference of Cd²⁺ in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants. – Acta Soc. Bot. Pol., 55: 291-304.
- Casano, L.M., L.D. Gomez, H.R. Lascano, C.A. Gonzales, V.S. Trippi, 1997. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photo-oxidative stress. – Plant Cell Physiol., 38:433-440.
- Clijsters, H. A. Cuypers, J. Vangronsveld, 1999. Physiological responses to heavy metals in higher plants; Defence against oxidative stress. – Z. Naturforsch., 54: 730-734.
- Cuypers, A., J. Vangronsveld, H. Clijsters, 2001. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. – Plant Physiol. Biochem., 39: 657-664.
- Faller, P., K. Kienzler, A. Krieger-Liszka, 2005. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. – Biochim. et Biophys. Acta, 1706:158-164.
- Greger, M., Lindberg, S., 1987. Effects of Cd²⁺ and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). II. Net uptake and distribution of Mg²⁺, Ca²⁺ and Fe²⁺/Fe³⁺. – Physiol. Plant. 68: 81-86.
- Hock, B., E. Elstner, 2005. Preface. – In: Plant Toxicology (Hock, B., E. Elstner, Eds.) Fourth Edition. Marcel Dekker, New York.
- Kamenova-Jouhimenko, S. M., Y. K. Markovska, V. T. Georgieva, 1997/1998. Effects of biomin and algae suspensions on the activities of carboxylating and decarboxylating enzymes in cadmium-treated pea plants. – Biol. Plant., 40 (3): 405-410.
- Kono, Y., I. Fridovich, 1982. Superoxide radical inhibits catalase. – J. Biol. Chem., 257: 5751-5754.
- Krupa, Z., T. Baszynski, 1995. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus - direct and indirect effects on light and dark reactions. – Acta Physiol. Plant., 7: 55-64.
- Кьpper, H., F. Кьpper, M. Spiller, 1998. *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. – Photosynth. Res. 58: 123-133.
- Landberg, T., M. Greger, 1994. Influence of selenium on uptake and toxicity of copper and cadmium in pea (*Pisum sativum*) and wheat (*Triticum sativum*). – Physiol. Plantarum, 90: 637-644.
- Lewis, M., 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. – Environm. Poll., 87: 319-336.
- Lidon, F., F. S. Henriques, 1992a. Effects of excess copper on the photosynthetic pigments in rice plants. – Bot. Bull. Academia Sinica, 33: 141-149.
- Lidon, F., F. S. Henriques, 1992b. Changes in the contents of photosynthetic electron carriers, RNAse activity and membrane permeability in copper-treated rice plants. – Photosynthetica, 26: 371-380.
- Lidon, F., F. S. Henriques, 1993. Oxygen metabolism in higher plant chloroplasts. – Photosynthetica, 29: 249-279.
- McGrath, S. P., 1987. Long-term studies of metals transfers following applications of sewage sludge. – In: Pollutant

- Transport and fate in Ecosystems. Special publication N 6 of the British Ecological Society. P. Coughtrey, M. Martin, M. Unsworth (Eds). Blackwell Scientific, Oxford, 301-317.
- Merakchiiska, M., I. Yordanov, 1983. The effect of some heavy metals upon growth, pigment content and photosynthetic activity of bean plants. – In: III National Conference of Botany, Sofia, Bulg. Acad. Sci., pp. 848-853.
- Milone, M. T., C. Sgherri, H. Clijsters, F. Navari-Izzo, 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. – Environ. Exp. Bot., 50: 265-276.
- Noctor, G., C. Foyer, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49:249-279.
- OECD, 1984. Guideline for testing chemicals. No 207. Earthworm, acute toxicity tests. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Somashekaraiah, B., K. Padmaja, A. Prasad, 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. – Physiol. Plant, 85: 85-89.
- Stiborova, M., Doubravova, M., Bresinova, A., 1988. Mechanism of action of Cu, Cd and Zn on ribulose 1,5-biphosphate carboxylase from barley (*H. vulgare* L.). – Photosynthetica, 22: 161-167.
- Stobart, A., W. Griffiths, I. Ameen-Bukhari, R. Sherwood, 1985. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. – Physiol. Plant., 63: 293-298.
- Stoyanova, E., M. Merakchiyska-Nikolova, 1991. Ultrastructure of the forming photosynthetic apparatus of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under the action of CuSO₄ and kinetin. – Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci., 44 (12): 93-96.
- Tukendorf, A., T. Baszynski, 1991. The *in vivo* effect of cadmium on photochemical activities in chloroplasts of runner bean plants. *Acta Physiol. Plantarum*, 13 (1), 51-57.
- Van Asshe, F., H. Clijsters, 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. – Plant, Cell and Environ., 13:195-206.
- Vangronsveld, J., H. Clijsters, 1992. A biological test system for the evaluation of metal phytotoxicity and immobilisation by additives in metal contaminated soils. – In: Metal compounds in environment and life, 4. Special supplement to Chemical Speciation and Bioavailability. (Eds. E. Merian, W. Haedi), Wilmington: Science Reviews Inc., 1992, pp. 117-125.
- Vassilev, A., F. C. Lidon, J. C. Ramalho, M. do Cũu Matos, M. da Graca, 2003. Effects of excess Cu on growth and photosynthesis of barley plants. Implication with a screening test for Cu tolerance. – J. Central European Agriculture, 4 (3): 227-235.
- Vassilev, A., F. Lidon, P. Scotti, M. da Graca, I. Yordanov, 2004. Cadmium-induced changes in chloroplast lipids and photosystem activities of barley plants. – Biol. Plant., 48 (1): 153-156.
- Vassilev, A., Fernando C. Lidon, Maria do Cũu Matos, Josũ C. Ramalho, Ivan Yordanov, 2002. Photosynthetic Performance and Some Nutrients Content in Cd and Cu-treated Barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. – J. Plant Nutr., 25 (11): 2343-2360.
- Vassilev, A., I. Yordanov, 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of Cd-treated plants: a review. – Bulg. J. Plant Physiol., 23 (3-4): 114-133.
- 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.
- Vassilev, A., M. Berova, Z. Zlatev, 1998. Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. – Biol. Plant., 41 (4): 601-606.
- Vassilev, A., P. Manolov, 1999. Chlorophyll fluorescence of barley (*H. vulgare* L.) seedlings grown in excess of Cd. – Bulg. J. Plant Physiol., 25 (3-4): 67-76.
- White, A. J., Ch. Critchley, 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. – Photosynthesis Research, 59: 63-72.
- Woolhouse, H.W., 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. – In: O. L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (Eds.) Physiological plant ecology II. Responses to the chemical and biological environment. Encyclopedia of plant physiology. New Series 12C, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 245-300.

Авторите изказват благодарност на Фонд "Научни изследвания" за предоставеното финансиране на проект ДО 02-88/2008.

Статията е приета на 12.07.2010 г.
Рецензент – доц. д-р Василий Голтсев
E-mail: goltsev@biofac.uni-sofia.bg