

А.И. Попов, В.В. Баранова, Д.Н. Шпанько, Е.А. Черкасова

БАЗОВЫЕ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ РЕСУРСОВ БОБОВЫХ В ЗОНЕ ПОВЫШЕННОГО АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Изучение предпочтений и склонности, а также, наоборот, устойчивости растений к накоплению различного рода токсикантов антропогенного происхождения, основанное главным образом на аспектах сравнения подробнейшим образом всесторонне изученного химического состава одного и того же растительного вида, сырье от которого заготовлено на экологически благополучных территориях и в зонах, характеризующихся критическим загрязнением, является особо перспективным и значимым направлением научных исследований по селекции и выявлению сортов растений, устойчивых к загрязнениям окружающей среды. Объектами для исследований были выбраны растения семейства бобовые, растительное сырье которых имеет огромное пищевое значение и широко применяется в медицинской практике.

Растения семейства бобовые, растительное сырье, Кемеровская область, экология, загрязнение токсичными агентами, фитохимический анализ, фитоэстрагены, накопление химических элементов.

Потери сырьевых источников, расположенных на территории бывших союзных республик, прогрессирующие тенденции в освоении минеральных ресурсов, интенсивные технологии в сельском хозяйстве, связанные с использованием средств, негативно влияющих на растительный покров, последствия отдельных экологических трагедий и т.п. резко обострили проблему полного обеспечения отдельных отраслей растительным сырьем в полном объеме и ассортименте.

Очень часто территориально обширные и доступные для сбора сырья заросли дикорастущих растений сосредоточены в зонах высокой антропогенной нагрузки, что является недопустимым при заготовке от них растительного материала для использования с пищевыми и медицинскими целями. Особенно это касается регионов с повышенной промышленной активностью, к которым относится и Кемеровская область.

За последние десятилетия довольно активно и часто нерационально использовались степные участки и сельскохозяйственные угодья, строились крупные промышленные комплексы, развитие которых в настоящее время хоть и медленными темпами, но все-таки происходит. Активно работает и развивается горнодобывающая промышленность, причем разработки ведутся большей частью открытым способом. В результате таких разработок на территории Кузбасса возникла целая серия открытых антропогенных сообществ (искусственных биогеохимических провинций). Произошло нарушение и повреждение верхней толщии земной коры (педосферы), значительно ухудшились или, по крайней мере, изменились санитарно-гигиенические условия жизни практически всех живых организмов.

Наряду с непосредственным вредным воздействием, которое проявляется в разрушении природного ландшафта, открытые разработки оказывают колоссальное косвенное влияние на окружающую среду. Изменяется микроклимат и водный режим территорий, что приводит к уменьшению прироста и гибели лесных массивов.

При выносе на поверхность токсических пород происходит стекание кислых вод, вызывающее гибель растительности и загрязнение акваисточников. Таким образом, открытые разработки полезных ископаемых приводят к разрушению веками создаваемых слоев почвы и исторически сложившихся биогеоценозов.

В ряде регионов земного шара имеются значительные территории с загрязненными почвами, которые не пригодны для земледелия из-за сильного обогащения элементами-токсикантами. Растительность, произрастающая в таких условиях, отличается специфическими особенностями флористического и морфологического характера, а также изменением химического состава. Однако исследования, затрагивающие эти факты, преимущественно ограничены решением частных вопросов, отражающих отдельные стороны экологии. Отсутствует комплексный биогеохимический подход к оценке происходящих явлений, и только совсем недавние современные исследования направлены на выявление и вскрытие связи различных морфологических аномалий растений с химизмом окружающей среды.

Располагая громадным энергетическим и производственным потенциалом, Кузбасс является одним из крупнейших промышленных центров, что привело к обострению экологической обстановки, носящей уже сейчас катастрофический характер.

Пылящие отвалы представляют собой техногенный ландшафт, созданный для аккумуляции и хранения каменноугольной золы, которая крайне склонна к эрозии и забивает устья растений, препятствуя их нормальному газообмену. Это приводит к значительным потерям растительного сырья. Положение обостряется и тем, что Кузбасс расположен в зоне резко континентального климата с сильными ветрами, что дополнительно способствует превращению отвалов в сильнейший очаг зольной эрозии. Поэтому все научно-исследовательские и практические работы, направленные на предотвращение пыления отвалов, являются приоритетными в области и напрямую касаются повышения продуктивности растительности.

Каменноугольная зола является специфическим субстратом, не имеющим аналогов в природе. Она быстро высыхает, особенно в верхних слоях, подвергается дефляции даже при незначительном ветре, в результате чего происходит задувание всходов растений. Рыхлое сложение отвалов способствует и тому, что даже искусственное покрытие их растительностью не приносит желаемых результатов, поскольку растения не могут достаточно крепко удержаться на такой поверхности и легко удаляются при малейшем физическом воздействии.

Загрязнение почв тяжелыми металлами также относится к наиболее распространенным видам антропогенного загрязнения, характерным для Кемеровской области.

Ксенобиотичные элементы, загрязняющие почву, концентрируются в верхнем слое (0-10 см). Так ведут себя свинец и ртуть, которые при антропогенном загрязнении на 57-74 % закрепляются в поверхностном слое и только 3-8 % мигрируют до глубины 30-40 см.

Передвижение свинца вглубь почвы осуществляется в виде хелата. Комплексы вторичных минералов с органическим веществом и гидроокислами играют важную роль в накоплении тяжелых металлов. Твердая фаза почвы и разлагающийся растительный опад создают растворимые органоминеральные соли тяжелых металлов, поступающие в растения.

Биодоступность кадмия для растительного организма напрямую зависит от свойств почвы в зоне корневой системы объекта. В почвах с низкой катионной емкостью (с небольшим содержанием ила и гумуса) адсорбция кадмия невелика, тогда как подвижность его достаточно высокая.

Вообще кислые почвы демонстрируют намного меньшую способность удерживать тяжелые металлы, чем нейтральные. Возможность перевода токсикантов в малоподвижное состояние также неодинакова у разных почв. Чем она выше, тем сильнее затормаживается поступление металлов в растение. Это важное обстоятельство следует учитывать при использовании загрязненных или загрязняемых земель для выращивания растительных культур, поскольку почвы со слабыми защитными возможностями не в состоянии обезопасить растение от атаки тяжелых металлов, предоставляя им самим вести борьбу с токсичными ионами.

Избыток химических элементов в почве имеет свои закономерности и характерно сказывается на развитии растения: по мере возрастания концентрации металлов в среде вначале задерживается рост, затем наступает хлороз листьев, который сменяется некрозами, и, наконец, повреждается корневая система.

Прямое воздействие избытка тяжелых металлов в растительных клетках протекает в двух направлениях и обусловлено блокировкой реакций с участием ферментов, или коагуляцией белков. Высокая концентрация токсикантов может характеризоваться и косвенным воздействием - переводом питательных веществ в недоступное состояние и созданием голодной сферы.

У ослабленных растений эффекты прямого и косвенного токсикоза значительно увеличиваются. При повышении уровня загрязнения инактивация токсикантов становится неполной, и поток вредных ионов атакует корни. Некоторую их часть растение способно перевести в менее активное состояние еще до проникновения их в корни: хелатировать с помощью корневых выделений и адсорбировать на внешней поверхности корней. И все же значительное количество токсикантов поступает в корни растения.

Специфические особенности распределения тяжелых металлов в растительном организме, установленные в опытах с различными культурами злаковых и бобовых, заключаются в том, что по степени насыщенности ими тканей основные органы растений располагаются в ряду: подземные органы > листья > семена > плоды. Содержание тяжелых металлов в тканях подземных органов и семенах этих семейств может различаться в 500-600 раз, что свидетельствует о высоких компенсаторных и защитных возможностях различных типов корневых систем.

Анализируя и сводя воедино опубликованные материалы и полученные нами данные, можно констатировать, что наиболее токсичными для высших растений являются подвижные и слабо подвижные в окисленной среде элементы. Среди них медь, свинец, кадмий и ртуть, в форме катионов энергично мигрирующие в кислых растворах и слабо подвижные в нейтральных и щелочных средах, а также умеренно мигрирующий кобальт, который подвижен и слабо подвижен (в зависимости от состава соединений) в восстановительной среде и инертен в окисленных условиях.

В крайних для существования условиях растения избирательно накапливают повышенное количество необходимых для него металлов, принимающих активное участие в биологических процессах.

Изучение предпочтений и склонности, а также, наоборот, устойчивости растений к накоплению различного рода токсикантов антропогенного происхождения необходимо начинать в сравнительном порядке, изначально подробнейшим и достоверным образом исследуя фитохимический и элементный состав растительного сырья, заготовленного в зонах экологического благополучия, а в последующем поэтапно и детально обследовать теми же методами объекты, собранные на антропогенно перегруженных территориях.

Настоящая работа является начальным этапом базовых фундаментальных исследований, являющихся основой для системного рационального использования растительных ресурсов в зонах повышенного антропогенного воздействия. В ней параллельно представлены результаты собственных исследований и некоторые обзорные литературные сведения, затрагивающие изучение в данном аспекте растений семейства бобовых, характерных для дикорастущей флоры Кузбасса и возделываемых здесь как сельскохозяйственные культуры.

Элементный состав растительного сырья определяли на базе нескольких аккредитованных независимых специализированных лабораторий с помощью отечественных спектрографов ИСП-30,

ДФС-8-1, а также PegS-2 (Германия). Спектрограммы фотометрировали на спектропроекторе ДСП-1, а определение элементов проводили с помощью атласа спектральных линий и спектров-стандартов квалификации «спектральные чистые», «Merk» и «Исари».

Так, установлено, что представители бобовых в надземной части энергично накапливают характерные для этого семейства никель, молибден, медь, свинец, в подземных органах - стронций, свинец, медь, никель. Внутри семейства особенно обогащены металлами астрагалы, люцерна, донник и некоторые клевера. Древесные породы, произрастающие на сильно загрязненных почвах, отличаются незначительным содержанием металлов в надземной части.

При определении количестве селена следует учитывать, что этот элемент рассматривается как один из важнейших критериев состояния окружающей среды.

Общая вариабельность концентраций металлов в дикорастущих представителях семейства бобовых составляет от 8 до 356 мкг, причем для всех видов отмечена большая изменчивость в содержании селена - 8-240 мкг/кг сухой массы. Среднее содержание данного элемента в большинстве других видов не превышало 100 мкг/кг, т.е. было близко к дефицитному.

При выборе культур, содержащих в своем минеральном составе значительные концентрации селена и с помощью которых можно легко вводить добавочные количества этого элемента в пищу, руководствовались требованием к использованию растительного сырья в свежесобранном виде, так как известно, что многие органические соединения селена летучи и при тепловой обработке утрачиваются. Большое значение имеет также временной период от сбора растительного сырья до получения готовой продукции, который должен быть непродолжительным.

Отвечают таким требованиям в первую очередь зеленые культуры бобовых, использование которых, как растительных накопителей селена, целесообразно для профилактики и коррекции его дефицита в питании человека.

Кроме того, именно представители семейства бобовых являются очень удачными и лабильными объектами селекционных исследований, целью которых является выведение перспективных сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к загрязнению почв тяжелыми металлами и не аккумулирующих их в своем организме.

Растительное сырье бобовых растений богато органическими аминокислотами, часть из которых является незаменимыми для организма человека, а также, что особенно важно, довольно редкими биологически активными веществами растительного происхождения - фитоэстрогенами [1, 2].

Идентификацию аминокислот проводили методом тонкослойной хроматографии. Для этого на пластинку «Сорбфил» в качестве свидетеля наносили 10 мкл 0,05 % раствора кислоты глутаминовой в спирте этиловом 95 %. На линию старта капали такое же количество спиртового извлечения измельченных бобов. Процесс хроматографирования проводили восходящим способом в системе растворителей н-

бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:1). Хроматограмму обрабатывали 1%-м раствором нингидрина в спирте этиловом 95 %, после чего пластинку нагревали в сушильном шкафу в течение 5-10 минут при температуре 105-110 °С. Проявившиеся пятна розового цвета характеризовались особенными значениями R_f, свойственными конкретным аминокислотам. Наибольшее по размеру пятно соответствовало глутаминовой кислоте. Содержание суммы аминокислот определяли по реакции с нингидрином в пересчете на кислоту глутаминовую [3].

Оптимальные условия определения суммы аминокислот установлены фотометрическим методом. Максимум поглощения окрашенного в фиолетовый цвет раствора находится при длине волны 590 нм. Доказано, что на величину оптической плотности оказывают влияние концентрации реагентов, количество буферного раствора, время нагревания на водяной бане, в связи с чем определено оптимальное значение pH (6,8), пределы подчинения закону Бугера-Ламберта-Бера (5-50 мкг/мл), значение удельного показателя поглощения (431± 8), количества 1%-го раствора нингидрина (3 мл) и фосфатного буфера (1 мл), время нагревания (30 мин) [4, 5].

Для определения содержания суммы аминокислот точную навеску измельченных семян (около 1 г) помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, добавляли 100 мл спирта этилового 70 %. Колбу закрывали пробкой и взвешивали с точностью до 0,01 г, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1-го часа. Затем колбу охлаждали, взвешивали и доводили до первоначальной массы спиртом этиловым 70 %. Извлечение фильтровали. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносили 1 мл извлечения, добавляли 1 мл фосфатного буферного раствора с pH 6,8, затем 3 мл 1%-го раствора нингидрина в спирте этиловом 95 %, нагревали на кипящей водяной бане 30 минут. Колбу охлаждали и доводили растворителем до метки.

Параллельно в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл 0,05 % раствора стандартного образца кислоты глутаминовой, добавляли остальные реактивы и доводили объем до метки.

Оптическую плотность полученных растворов измеряли на фотометре при длине волны 590 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворителя [4, 5].

Расчет содержания суммы аминокислот в растительном сырье в пересчете на кислоту глутаминовую проводили по известной формуле.

Содержание незаменимых аминокислот в плодах бобов составляло 95, гороха - 114, сое - 150 г/кг. Относительная погрешность не превышает ± 2,9 %.

Проведение информационно - аналитического исследования имеющихся (доступных) литературных данных позволило заключить, что выбранные в качестве объектов исследования семена сои, бобов и гороха обладают существенной фитоэстрогенной активностью. Следует отметить, что общая информация, касающаяся фитоэстрогенов, относительно однообразна, ограничена и скудна [1, 2, 5-8].

Исследования проводили методом хромато-масс-спектрологии, для чего измельченные семена экстрагировали спиртом этиловым 70 %, центрифугировали и осадки растворяли в циклогексане. Измерения осуществляли на приборе HP 6890-5973 («Аджилент», США), оборудованном кварцевой капиллярной колонкой с неполярной газохроматографической фазой HP-5MS, длиной 30 метров, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки фазы 0,25 мкм. В заключение исследований масс-спектры, снятые с вершин хроматографических пиков, сравнивали по стандартной методике с масс-спектрами библиотек «PMW TOX 3», «NISTO 2» или «WILEY 7 N» (США) [9].

Для определения фенольных фитоэстрогенов семена бобовых экстрагировали спиртом этиловым 95 %. Извлечение упаривали до водного остатка, который очищали от хлорофилла и липидов с помощью гексана. Из водного остатка флавоноиды извлекали этилацетатом. Экстракты упаривали до суха, сухой остаток растворяли в метаноле и наносили на хроматографические пластинки «Силуфол-254». Хроматографию флавоноидов проводили в системах растворителей хлороформ-метанол-раствор аммиака 25 % (70:30:3) (для определения формонетина, генистеина, биоханина А, кумэстрола) и хлороформ-метанол (80:20) (для определения дайдзеина). Изофлавоноиды идентифицировали по значениям R_f стандартов исследуемых веществ. Для количественного определения изофлавоноидов пятна на хроматографической пластинке удаляли вместе с адсорбентом, элюировали метанолом и спектрофотометрировали при длине волны 250-260 нм. Содержание изофлавоноидов определяли по калибровочному графику.

Методика выявления и идентификации ингибиторов трипсина осуществлялась путем добавления к измельченным семенам боратного буфера (рН 7,6) с последующей экстракцией. После центрифугирования в надосадочной жидкости определяли активность анализируемых веществ. В опытные пробирки приливали по 0,5 мл рабочего раствора трипсина для образования комплекса трипсин-ингибитор. Протеализ с казеином останавливали добавлением 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты, после чего в контрольные пробирки приливали по 0,5 мл раствора трипсина для выравнивания состава и объема смеси. Одновременно измеряли активность раствора трипсина без добавления ингибитора (экстракта), который использовался в качестве стандарта.

Определение трипсин-ингибиторной активности у разных видов объектов исследования следует проводить при различной степени связывания трипсина: в семенах гороха и бобов - при 25-50, сои - 40-90, фасоли - 40-75 % торможения, что позволяет установить существенные различия данного показателя в сырье этих растений.

Результат проведенных исследований - идентификация во всех изучаемых образцах токоферолов, а также веществ стероидной структуры, к которым относятся альфа-амирин, ситостерол, кампестерол и характерные для растительного сырья сои 3-дезоксипрегненолон и эргкост-5-ентриол. Кроме того, в отдельных образцах сырья удалось распознать вещества-инсектициды, наличие которых в семенах бобовых является нежелательным.

Впервые проведена количественная оценка содержания фитостеролов в семенах гороха, сои и бобов с использованием в качестве внутреннего стандарта 3-дезоксипрегненола. Обнаружено высокое (до 0,1 % по массе) содержание кампестерола и синестрола в семенах гороха. Подтверждено значительное содержание фитоэстрогенов дайдзеина и генистеина в бобах сои.

Учитывая результаты и заключения данного этапа настоящего исследования, а также обзорные сведения литературных источников, заявляющих о фармакологической активности фитоэстрогенов, и факты клинических наблюдений, позволяющие сделать вывод об эффективности этих веществ в области профилактики развития атеросклероза [10], следует считать семена гороха перспективным и доступным, относительно широкого распространения и стоимости, сырьем для составления прописей рецептов и производства биологически активных добавок, применение которых рекомендовано для предотвращения развития атеросклероза.

Такой научный подход подробного, детального исследования фитохимии широко известных и доступных видов сырья, в данном случае бобовых, с выявлением в них ранее не известных соединений, предположительно активно влияющих на отношение растительного объекта к поглощению различных токсических веществ из окружающей среды, является первым и базовым шагом к осуществлению решения глобальной проблемы - возможности выращивания новых селекционно созданных устойчивых к антропогенным загрязнениям сортов пищевых и лекарственных растений и заготовки от них сырья в зонах, характеризующихся критическим загрязнением.

Список литературы

1. Ботя В.А. Фитотерапия. Фитодиетика / В.А. Ботя [и др.]. - Кишинев, 1990. - 142 с.
2. Дудченко Л.Г. Пищевые растения-целители / Л.Г. Дудченко, В.В. Кривенко - Киев, 1985. - 128 с.
3. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии: в 2-х ч. / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. - М., 1980. - Ч. 2. - 482 с.
4. Максютин Н.П. Растительные лекарственные средства / Н.П. Максютин [и др.]. - Киев, 1985. - 280 с.
5. Петрушевский В.В. Биологически активные вещества пищевых продуктов / В.В. Петрушевский [и др.]. - Киев, 1985. - 128 с.
6. A case of laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact in vivo responses to exogenously administered estrogens / Н. Boettger-Tong [et al.] // Environ Health Persp. - 1998. - Vol. 106. - P. 369-373.

7. Dietary estrogens stimulate human breast cells to enter the cell cycle / C. Dees [et al.] // Environ Health Persp. - 1997. - Vol. 105/Suppl. 3. - P. 633-636.
8. DiPaola R. «Forum»: Herbal medicine is potent estrogen / DiPaola R., Gallo M. // Environ Health Persp. - 1999. - Vol. 107. - P. 137-139.
9. Whitten, P.L. Effects of normal, human concentration, phytoestrogen diet on rat uterine growth / Whitten P.L., Russel E., Naftolin F. // Steroids. 1992. - V. 57. P. 98-106.
10. The phytoestrogen content of rodent diets / J.E. Thigen [et al.] // Environ Health Persp. - 1999. - Vol. 107. - P. 182-183.

ФГОУ ВПО «Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт»,
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Марковцева, 5,

Кемеровская медицинская академия,
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а

SUMMARY

A.I. Popov, V.V. Baranova, D.N. Shpanko, E.A. Tcherkasova

Basic researches of vegetative resources bean rational use system in a zone of the increased anthropogenous effect

Studying of preferences and propensity, and also, on the contrary, stability of plants to any accumulation toxic substances the anthropogenous origin, based, mainly, on aspects of comparison of in detail comprehensively studied chemical compound of the same vegetative kind, raw materials from which is prepared in ecologically safe territories and in the zones characterised by critical pollution, is especially perspective and significant direction of research activities on selection and revealing of grades of the plants stable against environmental pollutions. Objects for researches had been chose family plants bean which vegetative raw materials have huge food significance and is widely applied in medical practice.

Family plants bean, vegetative raw materials, the Kemerovo region, ecology, pollution by toxic agents, the phytochemical analysis, vegetative hormones, accumulation of chemical elements.

