

Y. N. Vinogradova, I.I. Korshikov

Resistance to copper in vitro of peroxidase of *Populus deltoides* leaves of plants at Donbass metallurgical enterprises

УДК 678.083+577.158+581.45+634.942

Е. Н. Виноградова, И. И. Коршиков

Донецкий ботанический сад НАН Украины

УСТОЙЧИВОСТЬ К МЕДИ *IN VITRO* ПЕРОКСИДАЗЫ ЛИСТЬЕВ *POPULUS DELTOIDES* ИЗ НАСАЖДЕНИЙ МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЙ ДОНБАССА

In vitro визначали вплив градієнта концентрацій іонів міді на активність пероксидази, виділеної з листків рослин *Populus deltoides* Marsh., що ростуть поряд із металургійним і ртутним комбінатами та цинковим заводом в умовах міського скверу Донбасу. Виявлено вищу стійкість до інгібуючої дії Cu^{2+} пероксидази листків рослин промислових насаджень.

Influence of copper ions concentration gradient on the activity of peroxidase prepared from *Populus deltoides* Marsh. leaves was studied in vitro for plants growing near the mercury combine and zinc factory of Donbass and in a city square. Leaf peroxidase of plants from industrial territories was shown to be more resistant to Cu^{2+} inhibiting action.

Введение

В различных геохимических провинциях, почвы которых в различной степени обогащены тяжелыми металлами, и в условиях техногенных экотопов с загрязненными почвогрунтами и субстратами (отвалы горнорудных производств) формируются устойчивые популяции травянистых растений [1; 7; 8; 13]. В экстремальных усло-

© Е. Н. Виноградова, И. И. Коршиков, 2006

виях этих экотопов проявляются межвидовые, межпопуляционные и внутривидовые различия в устойчивости растений к тяжелым металлам [1; 3]. Металлоторантность адаптированных растений из популяций геохимических провинций и горнорудных отвалов, как правило, выше, чем у растений из незагрязненных металлами местообитаний [9; 12; 16; 17]. Адаптация растений к избыточному содержанию тяжелых металлов в среде обеспечивается несколькими типами механизмов одновременно (посредством предотвращения их поступления в клетки, запуском внутриклеточных механизмов детоксикации и защиты ферментов от инактивирующего действия ионов металлов) [5; 14]. В опытах *in vitro* показана более низкая чувствительность ферментов адаптированных растений к токсическому действию тяжелых металлов [6; 9]. Установлено, что в условиях *in vivo* механизмы токсичности металлов (в частности меди) отличались от таковых *in vitro* [5; 14].

Повышение устойчивости к токсическим газам возможно и у древесных растений в ходе их онтогенеза в зонах с умеренным загрязнением среды выбросами металлургических производств [10]. Адаптивные физиолого-биохимические перестройки в листьях устойчивых видов древесных растений этих техногенных экотопов могут сопровождаться изменением каталитических характеристик ферментов, в частности, пероксидазы, оперативно реагирующей на стрессовое влияние аэрополлютантов [10; 11]. Так как в выбросах металлургических предприятий содержатся аэрозоли тяжелых металлов, то не исключено, что при поступлении в клетки листьев они запускают механизмы формирования устойчивости, влияя на каталитические свойства ферментов и снижая их чувствительность к ингибирующему действию металлов. С целью проверки этого предположения проведен анализ влияния *in vitro* градиента концентраций ионов меди на активность пероксидазы, выделенной из листьев тополя канадского (*Populus deltoides* Marsh.), произрастающего в условиях разных металлургических производств Донбасса.

Материал и методы исследований

В исследованиях использовали листья растений *P. deltoides*, устойчивые насаждения которого находятся вблизи основных цехов металлургического, ртутного и цинкового заводов, а также растения этого вида, произрастающие в условиях фоновой степени загрязнения среды (сквер в «спальном» районе города). Следует отметить, что тополь канадский относится к ограниченному числу видов, устойчивых к влиянию техногенных эмиссий и широко используемых в озеленении территорий городов и промплощадок заводов Донбасса [1; 10].

Образцы листьев для лабораторных анализов отбирали в один срок с нескольких (10–13) деревьев репродуктивного возраста во второй половине вегетации. Для выделения пероксидазы (К.Ф. I.II.1.7) ферменты из фиксированных жидким азотом листьев экстрагировали 0,04 М трис-*HCl* буфером *pH* 7,4 с добавками 0,005 М ЭДТА и поликапролактанового порошка (1 : 10). Экстракты центрифугировали при 3000 об./мин в рефрижераторной центрифуге. В супернатанте белки осаждали сульфатом аммония в пределах насыщения от 20 до 90 %. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме бидистиллята и после диализа очищали на колонках с сефадексом G-25 (Pharmacia, Sweden) с использованием 0,04 М трис-*HCl* буфера *pH* 7,4. Фракции, в которых выявлена пероксидазная активность, объединяли, концентрировали при помощи полиэтиленгликоля (мол. масса 20000) и наносили на колонку с сефадексом G-100 (Pharmacia, Sweden), используя 0,04 М трис-*HCl* буфера *pH* 7,4. В полученных после геляфильтрации фракциях определяли содержание белка и активность гваяколпероксидазы. Все операции по выделению и очистке фермента про-

водили при температуре 0...–4°C. Суммарные фракции с высокой удельной активностью фермента в трех повторностях инкубировали с водными растворами сульфата меди в диапазоне концентраций 0,003–0,160 мМ Cu^{2+} при комнатной температуре в течение одного часа. В контрольные пробы добавляли воду в таком же объеме. Peroксидазную активность определяли спектрофотометрически на Spescol-11 с субстратом гваяколом [2], белок – по Бредфорду [15] (одновременно в пробах с медью и контрольных образцах). Активность фермента выражали в изменении оптической плотности на 1 мг белка. По результатам вычисляли коэффициент устойчивости фермента к токсиканту (K_y), равный отношению активности фермента в пробе с токсикантом к активности контрольной пробы [12]. Результаты экспериментов обрабатывали при помощи стандартных статистических методов.

Результаты и их обсуждение

Анализируя полученные результаты (рис.), можно констатировать, что активность пероксидазы листьев *P. deltoides* из насаждений техногенных экотопов повышена по сравнению с активностью фермента, полученного из листьев контрольных растений городского сквера. Наиболее существенными (в 2,5 раза) эти отличия в активности установлены для пероксидазы листьев растений ртутного комбината. Более высокий уровень активности пероксидазы листьев *P. deltoides* техногенных насаждений, возможно, является элементом компенсаторной ответной реакции на стрессовое воздействие аэротехногенных эмиссий.

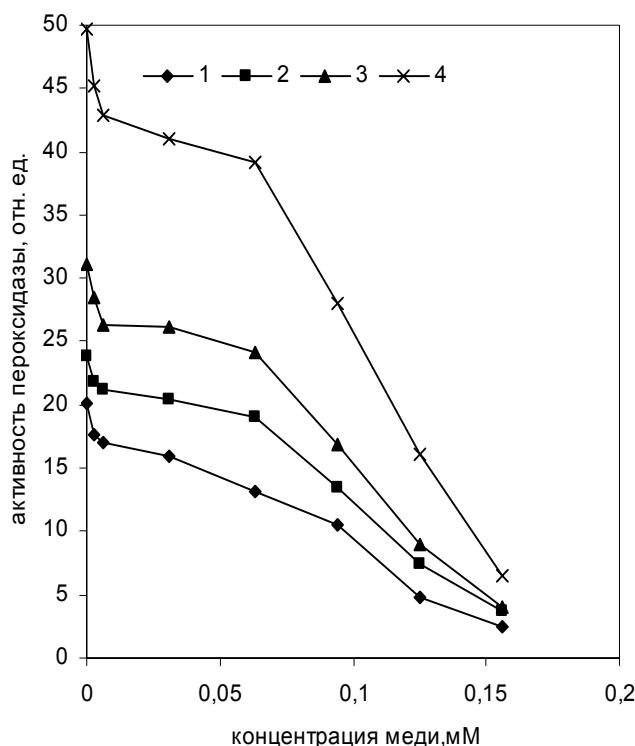


Рис. Влияние ионов меди на активность пероксидазы листьев *Populus deltoides* из насаждений, подверженных воздействию эмиссий разных металлургических производств Донбасса:

1 – городской сквер; 2 – металлургический комбинат; 3 – цинковый завод; 4 – ртутный комбинат.

Ионы меди в исследованном интервале концентраций вызывают снижение активности пероксидазы, выделенной из листьев *P. deltoides* всех изучаемых насаждений (см. рис.). Начальные концентрации ионов меди (0,003–0,006 мМ) ингибировали активность фермента на 10–15 %. При внесении в инкубационную среду меди в концентрации 0,094 мМ активность пероксидазы в анализируемых образцах снижалась на 40–50 %. Последующие концентрации токсиканта вызвали ингибирование активности фермента на 80–90 %.

Расчеты коэффициента устойчивости пероксидазы показывают, что для всех исследуемых концентраций меди наименьшие его значения свойственны пероксидазе растений городского сквера (табл.). Пероксидаза, выделенная из листьев растений *P. deltoides*, произрастающих в зоне действия выбросов трех металлургических производств, была более устойчива к ингибирующему действию ионов меди. Особенно отчетливо это проявилось при концентрации меди в 0,063 мМ. При добавлении в инкубационную среду такого количества меди коэффициент устойчивости пероксидазы к этому металлу растений городского сквера снизился до 0,66, а у растений техногенных экотопов – до 0,78–0,80.

Таблица

Устойчивость к действию ионов меди пероксидазы листьев *Populus deltoides* из насаждений, подверженных воздействию эмиссий разных металлургических производств Донбасса и городского сквера

Концентрация меди, мМ	Коэффициент устойчивости пероксидазной активности			
	городской сквер	металлургический комбинат	цинковый завод	ртутный комбинат
0,003	0,88 ± 0,03	0,91 ± 0,02	0,91 ± 0,04	0,91 ± 0,03
0,006	0,85 ± 0,02	0,89 ± 0,01	0,85 ± 0,05	0,86 ± 0,04
0,031	0,79 ± 0,01	0,84 ± 0,03	0,84 ± 0,03	0,82 ± 0,02
0,063	0,66 ± 0,03	0,80 ± 0,07	0,78 ± 0,04	0,79 ± 0,06
0,094	0,52 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,57 ± 0,04
0,125	0,24 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,32 ± 0,03
0,156	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02

Следует обратить внимание на тот факт, что пероксидаза листьев растений, произрастающих на разных металлургических производствах Донбасса, мало отличалась по устойчивости к меди, несмотря на существенные отличия в химическом составе выбросов металлургического, ртутного и цинкового заводов.

Медь относится к числу наиболее фитотоксичных элементов среди тяжелых металлов, входящих в состав выбросов промышленных производств, однако не является доминирующим ингредиентом. Благодаря малому диаметру атома, высокой его массе и способности легко изменять валентность, медь может образовывать стойкие комплексные соединения, в том числе и с физиологически важными органическими макромолекулами. Медь связывается сильнее других катионов, поэтому способна вытеснять их из комплексов с органическими лигандами [5]. Внутриклеточные механизмы толерантности растений обеспечиваются связыванием ионов меди фитохелатинами – белками, обогащенными SH-группами. Этот механизм универсален для тяжелых металлов, которые индуцируют синтез этих белков в клетках растений [3; 5; 14]. Специфические механизмы устойчивости растений к меди связывают с дальним ее транспортом и структурно-функциональной модификацией мембран, главным образом плазматических. В этом важная роль принадлежит никотианамину, Cu^{2+} -АТФазе и редуктазным системам [4; 5].

Вероятно, повышение устойчивости пероксидазы листьев растений *P. deltoides* техногенных экотопов к меди является результатом котолерантности и связано с изменениями конформационной структуры фермента, способствующими защите его активных центров от прямого действия поступающих в клетку экзогенных токсикантов (включая и медь). Это подтверждают другие кинетические характеристики полученных препаратов пероксидазы, которые были проанализированы нами ранее [10; 11]. У фермента, выделенного из листьев *P. deltoides* техногенных экотопов, отмечен минимальный сдвиг *pH*-оптимума в ацетатном буфере в щелочную область. Существенные отличия обнаружены в кинетических характеристиках очищенных препаратов пероксидазы: в значениях константы Михаэлиса и максимальной скорости окисления различных субстратов (бензидина, *n*-фенилендиамина, гваякола и пероксида водорода).

Для пероксидазы растений *P. deltoides*, испытывавших в ходе онтогенеза воздействие техногенных эмиссий, характерно более низкое сродство к субстрату, чем для фермента, полученного из листьев растений городского сквера. Исключение составляет пероксид водорода, степень сродства к которому выше для пероксидазы, выделенной из листьев растений *P. deltoides* техногенных насаждений, что, вероятно, связано с различной интенсивностью процессов перекисного окисления липидов в поврежденных поллютантами листьях. Пероксидаза, полученная из листьев *P. deltoides* металлургического и цинкового заводов, а также растений городского сквера, незначительно различалась по молекулярной массе: 38,0, 41,8 и 39,8 кД соответственно. Различия в компонентном составе пероксидазы *P. deltoides* исследованных насаждений, как показал электрофоретический анализ, были связаны только с минорными зонами [10; 11]. Это свидетельство высокой генетической однородности изучаемых растений *P. deltoides*, которые, как известно, в производственных питомниках размножаются вегетативно.

Внутриклеточные механизмы толерантности растений к токсичным газам и тяжелым металлам достаточно специфичны. По всей видимости, их активация у растений техногенных экотопов сопровождается генетически предопределенными структурно-функциональными модификациями ферментов, неселективно реагирующих на стрессовые и повреждающие воздействия. Ионы тяжелых металлов могут вызывать существенные нарушения метаболических процессов, изменяя конформацию ферментов при замещении в них конститутивных металлов. В этой связи важная роль принадлежит неспецифическим механизмам защиты ферментных систем от прямого влияния ионов тяжелых металлов. По всей видимости, такие механизмы свойственны клеткам листьев *P. deltoides* и активируются в процессе адаптации растений к условиям аэротехногенного загрязнения, что сопровождается снижением чувствительности ферментов к действию токсичных агентов, как это показано на примере влияния Cu^{2+} *in vitro* на активность пероксидазы.

Выводы

Выявлена более высокая устойчивость к ингибирующему действию меди *in vitro* пероксидазы листьев *P. deltoides*, произрастающих в зонах воздействия выбросов разных металлургических производств Донбасса, по сравнению с растениями городского сквера. Не установлено особой специфики в устойчивости *in vitro* к меди пероксидазы растений трех металлургических производств, несмотря на разное содержание меди в составе их выбросов. Специфичность влияния эмиссий этих производств на *P. deltoides* проявлялась в отличиях кинетических характеристик пероксидазы.

Библіографічні посилання

1. **Взаимодействие** растений с техногенно загрязненной средой / И. И. Коршиков, В. С. Котов, И. П. Михеенко и др. – К.: Наукова думка, 1995. – 190 с.
2. **Гавриленко В. Ф.** Большой практикум по физиологии растений / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, А. М. Хандобина. – М.: Высшая школа, 1975. – 391 с.
3. **Гуральчук Ж. З.** Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. – 1994. – Т. 26, № 2. – С. 107–117.
4. **Демидчик В. В.** Поступление меди в растения и распределение в клетках, тканях и органах / В. В. Демидчик, А. И. Соколик, В. М. Юрин // Успехи соврем. биол. – 2001. – Т. 121, № 2. – С. 190–197.
5. **Демидчик В. В.** Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений / В. В. Демидчик, А. И. Соколик, В. М. Юрин // Успехи соврем. биол. – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 511–525.
6. **Игошина Т. И.** Устойчивость к свинцу карбоангидразы *Melica nutans* (Poaceae) / Т. И. Игошина, А. В. Косицин. // Ботан. журн. – 1990. – Т. 75, № 8. – С. 1144–1150.
7. **Кабата-Пендиас А.** Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М.: Мир, 1989. – 439 с.
8. **Ковальский В. В.** Геохимическая экология. – М.: Наука, 1974. – 299 с.
9. **Косицин А. В.** Сравнительная реакция на свинец карбоангидразной активности различающихся по устойчивости к нему популяций *Salvia stepposa* и *Phlomis tuberosa* (Lamiaceae) / А. В. Косицин, Т. И. Игошина, Н. В. Алексеева-Попова // Ботан. журн. – 1988. – Т. 73, № 4. – С. 585–588.
10. **Коршиков И. И.** Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. – К.: Наукова думка, 1996. – 239 с.
11. **Коршиков И. И.** К вопросу о влиянии аэротехногенных воздействий на некоторые свойства растительных пероксидаз / И. И. Коршиков, Е. Н. Виногорова // Промислова ботаника: стан та перспективи розвитку. Тез. доп. IV Міжнар. наук. конф. – Донецьк, 2003. – С. 117–118.
12. **Металлоустойчивые популяции** *Aster alpinus* L. (Asteraceae) на обогащенных свинцом, цинком и медью почвах луговых степей северо-востока Башкирской АССР / Н. В. Алексеева-Попова, А. В. Косицин, Т. И. Игошина, Н. Л. Ильинская // Ботан. журн. – 1984. – Т. 69, № 4. – С. 466–473.
13. **Растения** в экстремальных условиях минерального питания / Под. ред. М. Я. Школьника, Н. В. Алексеевой. – Л.: Наука, 1983. – 176 с.
14. **Феник С. И.** Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам / С. И. Феник, Т. Б. Трофимьяк, Я. Б. Блюм // Успехи соврем. биол. – 1995. – Т. 115, вып. 3. – С. 261–275.
15. **Bredford M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
16. **Karataglis S. S.** Behaviour of *Agrostis tenuis* populations against copper ions in combination with the absence of some macronutrients elements // Deutsch. bot. Ges. – 1980. – Vol. 93, N 2. – P. 417–424.
17. **Rout Gyana R.** Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L.) Link / R. Rout Gyana, S. Sanghamitra, D. Premananda // Chemosphere. – 2000. – Vol. 40, N 8. – P. 855–859.

Надійшла до редколегії 17.01.06.