

## РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПЕРОКСИДАЗЫ – МАРКЕРЫ ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПРИРОДНЫХ СРЕД

**В статье приводятся экспериментальные данные о влиянии комплексного химического загрязнения природных сред на количественную и качественную изменчивость ферментных систем пероксидазы различных видов хвойных растений в местах прошлого уничтожения химического оружия.**

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7 – оксидоредуктаза) является ключевым ферментом окислительно-восстановительного обмена, широко распространена в вегетативных органах растений различных систематических групп, входит в состав основных клеточных структур и обладает разнообразной субстратной специфичностью [3, 7].

Пероксидаза является полифункциональной, гетерогенной по изозимному составу и подвергается значительной изменчивости под действием неблагоприятных условий среды, в том числе химического загрязнения [1, 7].

В отечественной и зарубежной научной литературе накоплены множественные сведения о влиянии химического загрязнения природных сред на количественные и качественные характеристики ферментных систем, в том числе растительных пероксидаз [4, 5, 11, 12, 14].

Известно, что пероксидазный состав растений существенно меняется под действием тяжелых металлов. В частности, повышение содержания железа в почве вызывает перестройку изоферментных спектров пероксидазы каштана конского и дуба черешчатого, что выражается в исчезновении одних изоформ и появлении других [9].

Многие исследователи отмечают трансформацию пероксидазного спектра в вегетативных органах культурных (пшеницы, кукурузы, горчицы, фасоли) и дикорастущих (сосны, барбариса, бересклета) форм под действием промышленного загрязнения атмосферы оксидами азота и серы [2, 4, 5, 8]. Однако на сегодняшний день остается практически не изученным комплексное влияние продуктов деструкции отравляющих веществ на количественную и качественную изменчивость растительных пероксидаз в местах прошлого уничтожения химического оружия. Не оценена перспектива использования изоперок-

сидаз в качестве маркеров комплексного химического загрязнения природных сред.

Изменчивость фермента изучалась на растительном материале, отобранном в местах прошлого уничтожения химического оружия на территории Пензенской области, вблизи пос. Леонидовка.

В 50-е годы прошлого столетия эта территория была загрязнена отравляющими веществами оружейного назначения: зарин, зоманом, люизитом и ипритом. В настоящее время исследуемый район насыщен продуктами деструкции отравляющих веществ: мышьяком, диоксинами, другими хлорорганическими токсинами.

В качестве объекта исследования нами использовались различные виды хвойных растений: сосна обыкновенная (*Pinus silvestris* L.), ель европейская (*Picea exelsa* Link.), ель колючая (*P. pungens* Engelm.). В образцах хвои исследовалась количественная и качественная изменчивость пероксидаз под влиянием комплексного химического загрязнения территории.

### Материалы и методы исследования

Исследования проводили в течение трех лет (2005-2007 гг.). В процессе эксперимента проанализировали 240 образцов, которые отбирали на шести стационарных учетных площадках в начале лета при температуре воздуха 22-25 °С.

Для лабораторного анализа использовали хвою с ветвей средней части кроны 50-летних деревьев. Повторность опыта четырехкратная. В процессе электрофореза закладывали три параллельные пробы.

Контрольные растительные образцы отбирали в незагрязненной зоне (Золотаревский сосновый бор), а опытные – в местах уничтожения химического оружия с различным уровнем загрязнения.

Для выделения фермента из растительной ткани навеску хвои (2 г) измельчали с помощью скальпеля, затем заливали семикратным объемом 0,005 М трис-глицинового буфера, содержащего 30% сахарозы, и гомогенизировали на холоде. Гомогенат в течение часа выдерживали при температуре 4 °С и центрифугировали при скорости 8 тыс. об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость использовали в качестве препарата пероксидазы.

Электрофорез пероксидазы проводили по модифицированной нами методике Дэвиса и Рейсфельда [6,10,15] в цилиндрических гелях размером 0,6x7,0 см в 7,5%-ном полиакриламидном геле с использованием трис-глициновой буферной системы рН = 8,3 с охлаждением. Время проведения электрофореза – 2 часа 20 минут. Первые 20 минут сила тока на гелевую трубку не превышала 2 мА, а затем ее увеличивали до 4 мА.

По окончании электрофореза гели опускали на 30 минут в 0,02%-ный раствор солянокислого бензидаина, а затем – в 0,01%-ный раствор пероксида водорода до появления голубых полос изофероксидазы. Затем реакционную смесь сливали, а гели промывали 10%-ным раствором уксусной кислоты.

Для идентификации фермента использовали промышленный препарат пероксидазы хрена.

Относительную активность отдельных изоформ определяли с использованием методики Лиу, по скорости их проявления [13].

Для удобства анализа изоферментных спектров катодные изофероксидазы по относительной электрофоретической активности (ОЭП) были условно разделены на три зоны: А-зона (ОЭП от 0 до 30), В-зона (от 31 до 60), С-зона (от 61 до 100).

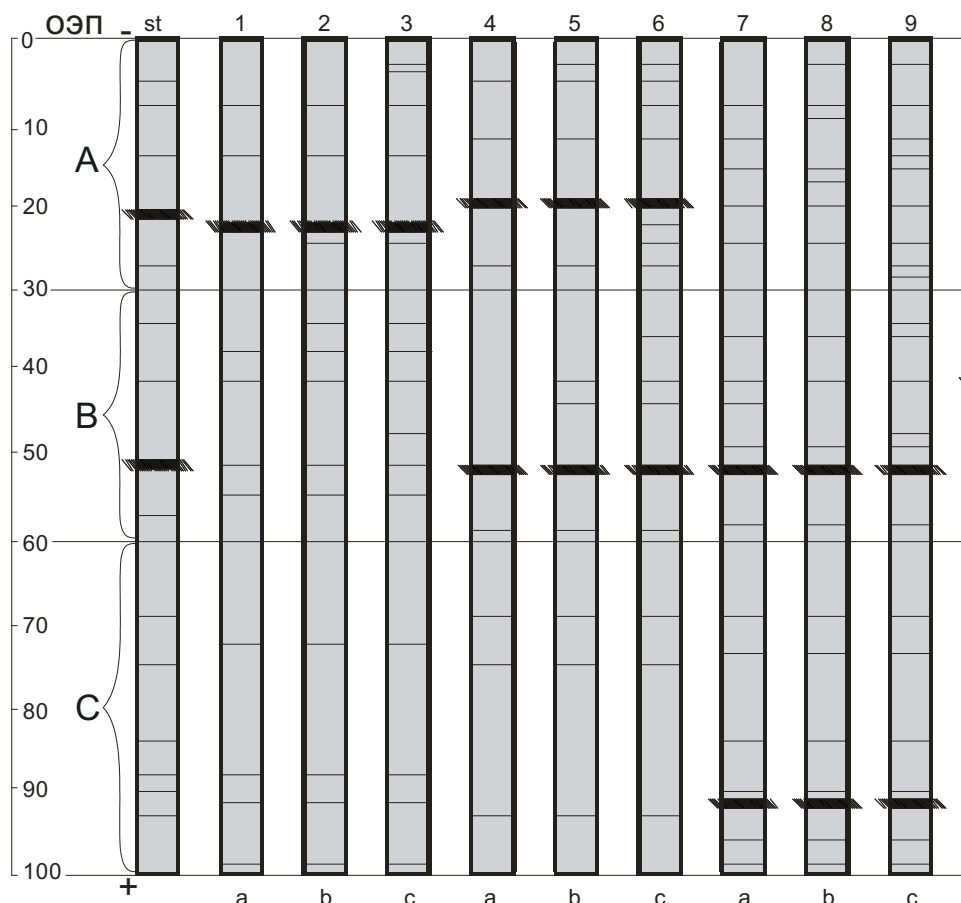


Рисунок. Электрофореграммы изоферментов пероксидазы хвойных растений в условиях химического загрязнения: 1-3 – *Pinus silvestris* L.; 4-6 – *Picea exelsa* Link.; 7-9 – *P. pungens* Engelm.: а – контроль, б – низкий уровень загрязнения; с – высокий уровень загрязнения

### Результаты и обсуждение

В современной научной литературе описаны многочисленные факты существенной количественной изменчивости растительного фермента пероксидазы в местах химического загрязнения природных сред [3, 4, 5].

Наши исследования показывают, что комплексное действие продуктов деструкции отравляющих веществ на вегетативные органы исследуемых растений приводит к существенным изменениям компонентного состава фермента (рис.).

Анализ электрофореграмм показывает, что в хвойных растениях, попавших в зону жесткого химического загрязнения, гетерогенность изозимного спектра пероксидазы существенно возрастает, что свидетельствует об адаптивной перестройке окислительно-восстановительных систем, связанной с приспособлением растений к жизни в условиях химического стресса.

Характерной особенностью изоферментных новообразований у хвойных является то, что появление новых изоформ в условиях химического стресса отмечается в основном в области «медленных» компонентов А-зоны, обладающих большей молекулярной массой и низкой электрофоретической подвижностью. В то же время «быстрые» компоненты С-зоны и среднеподвижные компоненты В-зоны существенных качественных изменений не претерпели.

Рассмотрим трансформацию изопероксидазного спектра на примере сосны обыкновенной, для фермента которой характерна высокая гетерогенность, что подтверждается достаточно большим (свыше десяти) числом изоформ в спектре.

Так, в изозимном спектре пероксидазы хвой в условиях низкого химического загрязнения новообразования выразились в возникновении в А-зоне компонента  $A_{24}$ , а в В-зоне – компонента  $B_{34}$ . В растениях, находящихся в эпицентре уничтожения химического оружия (вдоль реки Акулька, на Муравьиной поляне), гетерогенность анодной части спектра изопероксидаз еще более усилилась. Так, в области слабоподвижных компонентов (А-зона) новообразования выразились в появлении дополнительно еще двух изоформ –  $A_3$  и  $A_4$ , а

в спектре среднеподвижных компонентов (В-зона) появился новый изозим  $B_{48}$ .

Аналогичные закономерности проявились в наших исследованиях и на других хвойных растениях. Так, в изопероксидажном спектре ели европейской химическое загрязнение повлекло за собой образование двух новых компонентов в А-зоне –  $A_3$  и  $A_6$ ; одного компонента в В-зоне –  $B_{35}$ . Активная ответная реакция на химический стресс отмечена также у ели колючей, где в А-зоне проявились четыре, в В-зоне – два компонента.

В современной науке накоплен богатый экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что в условиях химического стресса нарушается протекание различных физиологических и биохимических процессов. Известно, что даже сверхмалые концентрации поллютантов в окружающей среде вызывают количественные и качественные изменения макромолекул в растительном организме. Причем наибольшей изменчивости подвергаются ферментные системы, в частности пероксидаза, степень трансформации которой в условиях химического стресса значительна [3, 6, 7].

Нами изучалась возможность использования количественной изменчивости изоферментов пероксидазы ели европейской для оценки сверхмалого загрязнения территории на значительном удалении от мест прежнего уничтожения химического оружия, где фиксировались следовые концентрации поллютантов.

Наши исследования показали, что сверхмалые химические загрязнения окружающей среды не вызывают качественных изменений в изозимном спектре пероксидазы хвой, в результате чего гетерогенность спектров катодных пероксидаз остается неизменной (табл.). В то же время на загрязненных территориях отмечаются существенные количественные изменения изопероксидаз. Оценка сопряженности уровня химического загрязнения с активностью отдельных изозимов пероксидазы позволила нам выделить три группы изозимов: положительно коррелирующие с уровнем загрязнения, отрицательно коррелирующие и «инертные», активность которых не зависела от присутствия загрязнителей.

Таблица. Влияние уровня химического загрязнения на количественную изменчивость пероксидазы *Picea exelsa* Link.

ОЭП изозима	Незагрязненная зона (контроль)		Зона сверхмалого загрязнения	
	активность изозима, %	суммарная активность группы, %	активность изозима, %	суммарная активность группы, %
4	12,7	А-зона 62,3 ± 1,3	14,6	А-зона 70,1 ± 1,2
11	14,3		15,9	
19	25,1		27,6	
27	10,2		12,0	
52	8,9	В-зона 14,6 ± 0,6	7,8	В-зона 13,9 ± 0,6
58	5,7		6,1	
69	7,7	С-зона 23,1 ± 0,9	5,6	С-зона 16,0 ± 1,5
74	8,5		6,4	
93	6,9		4,0	

В первую группу вошли все изоферменты А-зоны, во вторую – изозимы С-зоны. В то же время В-зона характеризовалась наличием в ней изоформ, обнаруживающих как прямую, так и обратную зависимость по отношению к уровню химического загрязнения. Следует также отметить, что во всех трех зонах катодной части спектра обнаружены изозимы, которые в условиях загрязнения окружающей среды не меняют активности.

На наш взгляд, изозимы А-зоны являются ответственными за адаптивные, а возмож-

но, защитные реакции растительных тканей в условиях химического стресса.

Таким образом, новообразования в изозимном спектре пероксидазы хвой сосны и ели названных видов могут служить объективными показателями уровня комплексного химического загрязнения природных сред.

Суммарная относительная активность катодных изоферментов А-группы хвой ели европейской может использоваться в качестве показателя сверхмалых следовых химических загрязнений окружающей среды.

**Список использованной литературы:**

1. Карташова Е.Р., Руденская Г.Н., Юрина Е.В. Полифункциональность растительных пероксидаз и их практическое использование // С.-х. биология. Сер. Биология растений. – 2000. – №5. – С. 63-70.
2. Неверова О.А. Использование активности пероксидазы для оценки физиологического состояния древесных растений и качества атмосферного воздуха г. Кемерово // Krylovia. – Т. 3. – №2. – 2001. – С. 122-128.
3. Савич И.М. Пероксидазы – стрессовые белки растений // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 107. – №3. – С. 406-417.
4. Сарсенбаев К.Н., Мезенцева Н.И., Полимбетова Ф.А. Влияние двуокиси серы на активность и компонентный состав свободной и связанной фракций пероксидазы проростков яровой пшеницы // Физиол. и биох. культ. растений. – 1983. – Т. 15. – №1. – С. 51-55.
5. Сарсенбаев К.Н., Полимбетова Ф.А. Роль ферментов в устойчивости растений. Алма-Ата: Наука, 1986. – 184 с.
6. Стаценко А.П., Иванов А.И., Конкина Е.Е., Сергеева О.В., Тужилова Л.И. Об изменчивости изоферментов растений в условиях химического загрязнения // Естественное и гуманитарное, 2007. – Т. 4. – №1 – С. 50-52.
7. Титов А.Ф. Полиморфизм ферментных систем и устойчивость растений к экстремальным (низким) температурам // Успехи современной биологии. – 1978. – Т. 85. – №1. – С. 63-70.
8. Филиппова А.В. Эколого-биологическая характеристика хвойных растений и локальный мониторинг / Автореф. дисс. канд. биол. наук. Кемерово. – 2006. – 21 с.
9. Шацкая Р.М. Интродукция и акклиматизация растений. Киев, 1986, №5. – С. 31.
10. Davis B.J. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins // Ann. New York Acad. Sci. – 1964. – 12, №4. – P. 404-427.
11. Jüger H.J. Physiologische und biochemische Wirkungen von SO<sub>2</sub> auf Pflanzen. // Phyton, 1977. – 18. – №1/2. – P. 85-94.
12. Jüger H.J. Wirkung von SO<sub>2</sub> – Belastung auf die Aktivität von Enzymen des Aminosäurestoffwechsels und den Gehalt freier Aminosäuren in unterschiedlich resistenten Pflanzen. // Z. Pflanzenkrankh und Pflanzenschutz, 1976. – 82. – №3. – P. 139-148.
13. Liu E.H. Simple method for determining the relative activities of individual peroxidase isozymes in a tissue extract // Anal. Biochem, 1973. – №1. – P. 149-154.
14. Mukherji S., Maitra P. Growth and metabolism of germinating rice (*Oryza sativa* L.) seeds as influenced by toxic concentrations of lead. // J. Pflanzenphysiol. – 1977. – 81. – №1. – P. 21-33.
15. Reisfeld R.A., Lewis U.I., Williams D.E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel // Nature, 1962. – 195. – №4838. – P. 281-283.