

УДК 581.17: 581.19: 581.52

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА И ПРОЯВЛЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЛИСТЬЯХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Гарифзянов А.Р.

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, Тула,

e-mail: Garifzyanov86@yandex.ru

В статье приведены результаты исследования комплекса физиолого-биохимических показателей 7 видов древесных растений, произрастающих в условиях промышленного загрязнения и инициированного загрязнителями окислительного стресса. Показано, что *P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* и *B. pendula* проявляют видоспецифичную реакцию на повышенное содержание загрязнителей в среде, выражающуюся в избыточной генерации перекиси водорода в листьях, в повреждении мембран вследствие перекисного окисления, снижении количества и изменении соотношения фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а и b, зеленых и желтых пигментов). В листьях *S. aucuparia*, *Ac. platanoides* и *L. sibirica* признаки окислительного стресса отмечены не были.

Ключевые слова: промышленное загрязнение, древесные растения, активные формы кислорода, перекись водорода, окислительный стресс

PEROXIDE HYDROGEN FORMATION AND OXIDIZING STRESS DISPLAY IN WOOD PLANTS LEAVES IN THE INDUSTRIAL POLLUTION CONDITIONS

Garifzyanov A.R.

The Tula state pedagogical university of L.N. Tolstoy, Tula, e-mail: Garifzyanov86@yandex.ru

In article results of a physiology-biochemical indicators complex research of 7 the wood plants kinds growing in the industrial pollution conditions and oxidizing stress initiated by pollutants are resulted. It is shown that *P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* and *B. pendula* show specific reaction to the raised maintenance of pollutants in the environment, expressed in superfluous generation of hydrogen in leaves peroxide, in damage of membranes owing to peroxide oxidations, decrease in quantity and change of a parity of photosynthetic pigments (a chlorophyll a and b, green and yellow pigments). In leaves *S. aucuparia*, *Ac. platanoides* and *L. sibirica* signs of oxidizing stress haven't been noted.

Keywords: industrial pollution, wood plants, active oxygen forms, hydrogen peroxide, oxidizing stress

Урбанизированные территории испытывают антропогенное давление многочисленных факторов, среди которых преобладающую роль играют промышленные предприятия и транспорт. В окрестностях локальных источников загрязнения повреждение растений может привести к полной деградации природных комплексов [7].

Как известно, загрязнители (в том числе тяжелые металлы) инициируют развитие в клетках живых организмов окислительного стресса, обязательным условием возникновения которого является избыточное образование активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-радикал (анион-радикал) $O_2^{\cdot-}$, гидроперекисный радикал $HO_2^{\cdot}$, гидроксил-радикал $HO^{\cdot}$, перекись водорода H_2O_2 , синглетный кислород 1O_2 [10]. В результате повышенной генерации АФК в клетках может произойти окисление липидов, углеводов, белков, повреждение ДНК и РНК, дезорганизация цитоскелета [5].

Несмотря на имеющиеся в научной литературе данные об индукции образования АФК под действием различных абиотических факторов, многие особенности механизма развития окислительного стресса в техногенных условиях остаются неясны-

ми. Это, в первую очередь, касается выяснения видоспецифических особенностей протекания окислительного стресса. На основании вышеизложенного было организовано исследование, целью которого являлось изучение комплекса физиолого-биохимических показателей древесных растений, произрастающих в условиях промышленного загрязнения, в связи с инициируемым окислительным стрессом.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны 7 преобладающих в условиях урбозокосистем видов древесных растений: *Sorbus aucuparia* L., *Betula pendula* Roth., *Populus nigra* L., *Tilia cordata* Miller., *Acer platanoides* L., *Aesculus hippocastanum* L., *Larix sibirica* Ledeb. Листья растений отбирали с ветвей 1–2 года жизни на расстоянии 2–3 метров от поверхности грунта по периметру кроны деревьев типичного габитуса одного возраста. Пробоотбор проводили на территории 3-х постоянных модельных площадок, различающихся по уровню загрязненности почвенного покрова тяжелыми металлами (табл. 1).

Содержания перекиси водорода в листьях определяли по методу, основанному на образовании окрашенного комплекса пероксида титана [6]. Оценка степени перекисного окисления липидов (ПОЛ) была проведена по методу, основанному на определении

количества соединений, взаимодействующих с тиробарбитуровой кислотой в пересчете на малоновый диальдегид (МДА) [8]. Содержание фотосинтетиче-

ских пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) определяли спектрофотометрически в этанольных экстрактах [9].

Таблица 1

Геохимическая характеристика модельных площадок [2]

Точка пробоотбора	Местоположение	Химическая ассоциация*	Превышение ПДК (ОДК)	Суммарный показатель загрязнения (Z_c)**
I	ОАО «Косогорский металлургический завод»	Fe, Mn, Ti, Sc, V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Rb, Sr, Zr, Ba, Pb	Mn (в 4,7 раз), Zn (в 2 раза), Pb (1,4 раза)	34
II	ОАО СП АК «Тулачермет», ОАО «Ванадий-Тулачермет», ОАО «Палема»	Fe, Mn, Ti, Sc, V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Rb, Sr, Zr, Pb	Zn (в 1,2 раза)	24
Контроль	Центральный парк культуры и отдыха им. П.П. Белюсова	---	---	0

Примечания:

* – группа элементов, обнаруживаемая в изучаемом объекте в количестве, отличном от критериального (фоновом) уровня;

** – суммарный показатель загрязнения (Z_c) – аддитивная сумма превышений коэффициентов концентраций химических элементов над критериальным (фоновым) уровнем.

Каждый опыт проводили в трех биологических по три аналитических повторности. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета прикладных компьютерных программ MS Excel 2003 и SigmaStat 3.1. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения определяемых величин и их стандартные ошибки ($P > 0,95$).

Результаты исследования и их обсуждение

Перекись водорода является относительно стабильным соединением (время жизни около 1 мс), способным диффундировать от места образования [3]. Проведенное исследование показало, что ее содержание в листьях в контроле

колебалось в пределах от $0,018 \pm 0,004$ до $0,104 \pm 0,010$ ммоль/г сырой массы (рис. 1). При этом наибольший уровень данной АФК был обнаружен в листьях *Ac. platanoides*, наименьший – у *P. nigra*. Различные поллютанты, в том числе тяжелые металлы, могут способствовать избыточной генерации в клеточных компартментах H_2O_2 . В результате проведенного исследования установлено, что в листьях *P. nigra*, *T. cordata* и *B. pendula*, произрастающих в условиях промышленного загрязнения, содержание перекиси было соответственно в 2,5, 1,8–2,5 и 1,5 раза больше, чем в контроле.

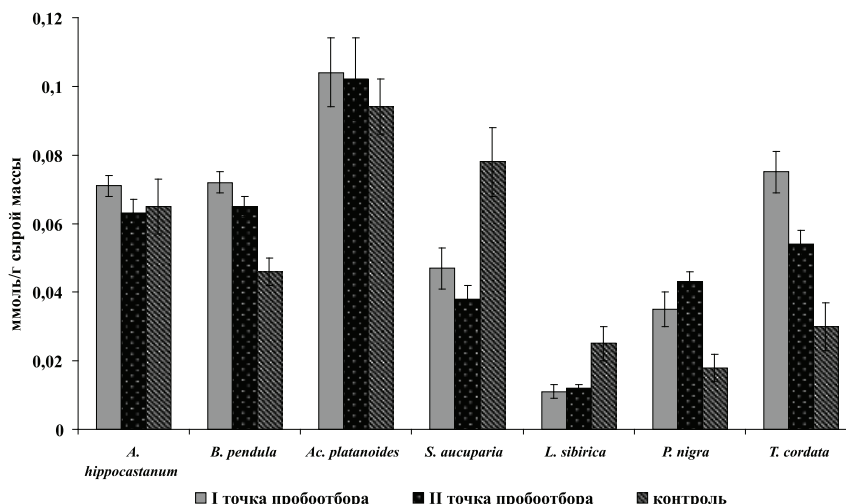


Рис. 1. Содержание перекиси водорода в листьях древесных растений

Известно, что перекись водорода, генерирующаяся в стрессовых условиях, способна вызвать широкий спектр повреждений [5]. При этом одной из основных мишеней дей-

ствия H_2O_2 , как и других АФК, являются липиды. Проведенное исследование показало, что содержание МДА, являющегося продуктом перекисного окисления фосфолипидов

мембран, в листьях контрольных растений определялось видовой принадлежностью (рис. 2). В целом конститутивный уровень МДА находился в пределах от $0,48 \pm 0,14$ до $2,47 \pm 0,22$ нмоль/г сырой массы в зависимости от вида растения. Высоким конститутивным уровнем диальдегида характеризовались листья *Ac. platanoides*, превышающим такой показатель для других видов в 2–5 раз. Наименьший конститутивный уровень МДА был характерен для листьев *B. pendula* ($0,48 \pm 0,14$ нмоль/г сырой массы).

Выше было показано, что произрастание древесных растений в условиях промышленного загрязнения приводит к изменению количества H_2O_2 в их тканях (см. рис. 1). Содержание малонового диальдегида также варьировалось в зави-

симости от вида и точки произрастания. В частности, уровень МДА был выше контрольного значения в среднем на 35 %, на 27–45 % и в 2 раза соответственно, в листьях *P. nigra*, *T. cordata* и *B. pendula*. По-видимому, генерация перекиси в листьях древесных растений обуславливала увеличение интенсивности ПОЛ, диагностируемое по возрастанию количества МДА. Данное предположение подтвердилось рассчитанными положительными коэффициентами корреляции в паре признаков « H_2O_2 –МДА», равными 0,98 (*B. pendula*), 0,88 (*P. nigra*) и 0,5 (*T. cordata*). Таким образом, для клеток *P. nigra*, *B. pendula* и *T. cordata*, произрастающих в условиях промышленного загрязнения, было характерным развитие окислительного стресса.

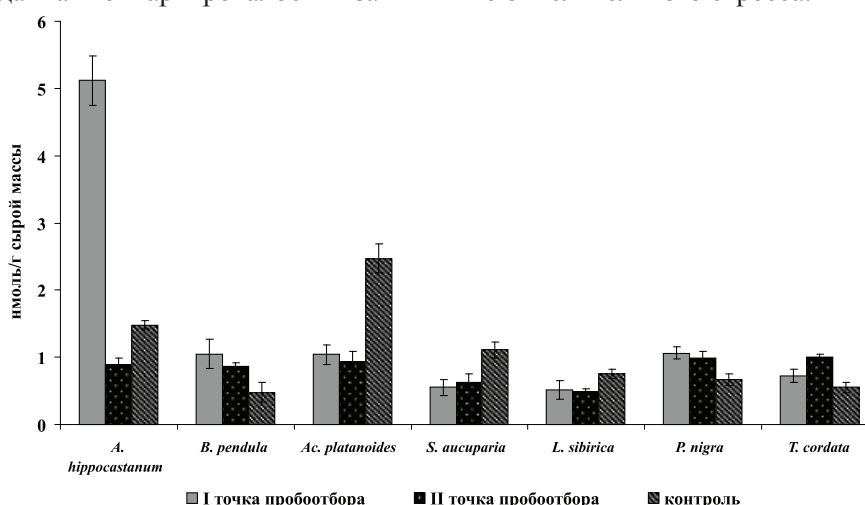


Рис. 2. Содержание малонового диальдегида (МДА) в листьях древесных растений

Кроме того, в результате проведенного исследования были выявлены виды древесных растений, в листьях которых интенсивность окислительных процессов снижалась в условиях техногенно загрязненной среды. В частности, в листьях *Ac. platanoides*, *L. sibirica* и *S. aucuparia* количество МДА было меньше в среднем в 2,7, 2 раза и на 30 % соответственно чем в контроле. Реакция *A. hippocastanum* значительно отличалась от других видов. Содержание МДА в листьях этого растения, произрастающего в условиях I точки пробоотбора, значительно превосходило контрольные величины (в 3,5 раза). Однако в условиях II точки пробоотбора происходило снижение количества МДА на 42 %. Данное обстоятельство может быть связано с индивидуальными метаболическими перестройками *A. hippocastanum*, происходящими в результате воздействия поллютантов.

Известно, что интенсификация процессов ПОЛ, обусловленная воздействием пол-

лютантов, может негативно сказываться на метаболизме растений. Хлоропласты являются мощными источниками АФК, что связано с перевосстановлением и перевозбуждением антенных комплексов в результате дисбаланса между поглощением квантов световой энергии и возможностью ее реализации в фотосинтезе [4]. В соответствии с этим одним из наиболее чувствительных к техногенному загрязнению аппаратов растений является фотосинтетический, критическим для функционирования которого является количество пигментов и соотношение их разных групп.

Проведенное исследование показало, что виды древесных растений значительно различались по количеству пигментов. Содержание хлорофилла *a* колебалось в пределах от $1,89 \pm 0,23$ до $4,76 \pm 0,67$ мг/г, хлорофилла *b* – от $0,76 \pm 0,16$ до $1,83 \pm 0,13$ мг/г сырой массы (табл. 2). При этом максимальным конститутивным уровнем хлорофилла *a* и *b* характеризовались листья *A. hippocastanum*, минимальным – *P. nigra*.

Содержание каротиноидов также сильно варьировало – от $0,43 \pm 0,11$ мг/г в листьях *P. nigra* до $1,07 \pm 0,11$ мг/г у *A. hippocastanum* (см. табл. 2).

Таблица 2

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях древесных растений

Вид	Точка пробоотбора	Содержание, мг/г сырой массы $\pm \sigma$		
		хлорофилла <i>a</i>	хлорофилла <i>b</i>	каротиноидов
<i>A. hippocastanum</i>	I	$0,68 \pm 0,11$	$0,36 \pm 0,12$	$0,21 \pm 0,09$
	II	$0,72 \pm 0,12$	$0,46 \pm 0,14$	$0,27 \pm 0,08$
	контроль	$4,76 \pm 0,67$	$1,83 \pm 0,13$	$1,07 \pm 0,11$
<i>B. pendula</i>	I	$0,96 \pm 0,13$	$0,59 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,09$
	II	$0,80 \pm 0,18$	$0,57 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,07$
	контроль	$1,89 \pm 0,23$	$0,77 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,09$
<i>Ac. platanoides</i>	I	$0,97 \pm 0,21$	$0,38 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,09$
	II	$0,88 \pm 0,14$	$0,37 \pm 0,09$	$0,20 \pm 0,06$
	контроль	$3,35 \pm 0,55$	$1,29 \pm 0,11$	$0,72 \pm 0,09$
<i>S. aucuparia</i>	I	$1,50 \pm 0,13$	$0,60 \pm 0,15$	$0,39 \pm 0,07$
	II	$1,24 \pm 0,12$	$0,50 \pm 0,16$	$0,32 \pm 0,04$
	контроль	$2,56 \pm 0,10$	$1,06 \pm 0,11$	$0,67 \pm 0,09$
<i>L. sibirica</i>	I	$0,82 \pm 0,08$	$0,34 \pm 0,09$	$0,19 \pm 0,03$
	II	$0,91 \pm 0,11$	$0,39 \pm 0,12$	$0,21 \pm 0,05$
	контроль	$2,88 \pm 0,35$	$1,16 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,13$
<i>P. nigra</i>	I	$0,70 \pm 0,11$	$0,43 \pm 0,13$	$0,29 \pm 0,03$
	II	$0,32 \pm 0,09$	$0,32 \pm 0,10$	$0,15 \pm 0,02$
	контроль	$1,89 \pm 0,11$	$0,76 \pm 0,16$	$0,43 \pm 0,11$
<i>T. cordata</i>	I	$0,70 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,09$	$0,30 \pm 0,04$
	II	$0,16 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$
	контроль	$2,56 \pm 0,21$	$0,86 \pm 0,11$	$0,58 \pm 0,11$

Сравнительный анализ содержания различных групп фотосинтетических пигментов в листьях древесных растений в условиях промышленного загрязнения показал, что универсальной реакцией растений на стресс является снижение их количества. В частности, при произрастании в условиях СЗН количество хлорофиллов *a* и *b* оказывалось меньше, чем в контроле в 2–16 и 1,3–9 раз соответственно. Наибольшая убыль хлорофиллов была характерна для листьев *A. hippocastanum* и *T. cordata*. Наиболее значительным уменьшение количества каротиноидов оказалось у *A. hippocastanum* (в 5 раз) в I точке пробоотбора и *T. cordata* (в 7 раз) во II; наименьшим – для *P. nigra* в I и II точках пробоотбора.

В настоящее время хорошо известно, что по своим функциональным свойствам молекулы пигментов неравнозначны: одни из них входят в состав реакционных центров фотосистем, другие выполняют только светособирающую функцию, поэтому критичным для поддержания нормального уровня фотосинтеза и сопряженных энергетических процессов является соотношение разных групп фотосинтетических пигментов. Проведенное нами исследование показало, что соотношение двух форм хлорофилла (*a/b*) в листьях древесных растений различалось (см. табл. 2). При этом в контрольной точ-

ке это соотношение колебалось в пределах 2,4–3,0, т.е. находилось в пределах физиологической нормы. Однако увеличение количества поллютантов в среде приводило к значительным модификациям данного показателя. В частности, для 4 изученных видов (*P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* и *B. pendula*) было выявлено снижение соотношения количества хлорофилла *a* и *b* в 1,5–2,5, 2, 1,5–2 и 1,5 раза соответственно. В то же время в листьях *S. aucuparia*, *L. sibirica* и *Ac. platanoides* одновременно с уменьшением количества хлорофиллов их соотношение оставалось практически неизменным и соответствовало контрольным значениям.

Еще одним важным показателем напряженности энергетических процессов в хлоропластах является соотношение пулов зеленых и желтых пигментов (Хл(*a + b*)/Кар). Проведенное исследование показало, что соотношение «Хл(*a + b*)/Кар» в листьях контрольных растений находилось в пределах от 5,40 (*S. aucuparia*) до 6,44 (*Ac. platanoides*). Такое соотношение фотосинтетических пигментов является типичным для здоровых, хорошо функционирующих зеленых растений. Однако произрастание растений в условиях, характеризующихся повышенным содержанием тяжелых металлов в почве, приводило к изменению величины данного показателя.

По показателю отношения общего хлорофилла и каротиноидов виды древесных растений образуют те же группы, что и при анализе соотношения различных форм хлорофиллов, т.е. в листьях *P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* и *B. pendula* отношение «Хл(a + b)/Кар» было ниже контрольной величины на 20–30, 34–45, 18–28 и 16–20% соответственно, а в листьях *S. aucuparia*, *Ac. platanoides* и *L. sibirica* соотношение соответствовало контрольному (см. табл. 2).

Поскольку в листьях *S. aucuparia*, *Ac. platanoides* и *L. sibirica* соотношение фотосинтетических пигментов оставалось в пределах нормы, то общее снижение их количества, по-видимому, отражает не столько характер поврежденности аппарата фотосинтеза в целом, сколько переход на новый физиологический уровень функционирования, что позволяет ему относительно стабильно работать, но, возможно, с меньшей эффективностью. Одновременно с этим разбалансировка между количеством фотосинтетических пигментов в листьях *P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* и *B. pendula* свидетельствует о неблагоприятных изменениях активности фотосинтетического аппарата, что в конечном итоге может отразиться на росте и продуктивности растений. Снижение количества пигментов с одновременным изменением их соотношения у *P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* и *B. pendula* может быть следствием нарастающего под действием поллютантов окислительного стресса.

На сегодняшний день хорошо известно, что мембраны тилакоидов являются мишенями H_2O_2 [4]. В соответствии с этим можно предположить, что снижение количества фотосинтетических пигментов и падение величины отношения количества зеленых и желтых пигментов является, отчасти, следствием ПОЛ, степень которого возрастает при окислительном стрессе, индуцированном промышленными загрязнителями (см. рис. 2). Корреляционный анализ взаимоотношений в паре признаков «накопление МДА» и «соотношение Хл(a + b)/Кар» подтвердил данную гипотезу. Выявлен отрицательный коэффициент корреляции (r) между интенсивностью ПОЛ в листьях *P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* и *B. pendula* и соотношением зеленых и желтых пигментов в них. Он оказался равным -0,84, -0,75, -0,55 и -0,88 соответственно.

Выводы

Таким образом, проведенное исследование показало, что генерация H_2O_2 в тканях *P. nigra*, *T. cordata*, *A. hippocastanum* и *B. pendula* в результате воздействия поллютантов приводила к разнонаправленным изменениям метаболических реакций, обе-

спечающих гомеостаз. Данные нарушения проявлялись в повреждении мембран вследствие ПОЛ, снижении количества и изменении соотношения фотосинтетических пигментов (хлорофиллов, зеленых и желтых пигментов). В листьях *S. aucuparia*, *Ac. platanoides* и *L. sibirica* признаки окислительного стресса отмечены не были, а снижение количества фотосинтетических пигментов, происходящее на фоне стабильного их соотношения, по-видимому, отражало переход фотосинтетического аппарата на новый физиологический уровень функционирования. Это становилось возможным благодаря функционированию в тканях *S. aucuparia*, *Ac. platanoides* и *L. sibirica* мощной антиоксидантной системы, изменение активности компонентов которой в условиях промышленного загрязнения было показано в предыдущих публикациях [1].

Список литературы

1. Сравнительный анализ активности компонентов антиоксидантной системы древесных растений в условиях техногенного стресса / А.Р. Гарифзянов, С.В. Горелова, В.В. Иванцев, Е.Н. Музафаров // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2009. – С. 45–48.
2. Оценка возможности использования древесных растений для биоиндикации и биомониторинга выбросов предприятий металлургической промышленности / С.В. Горелова, А.Р. Гарифзянов, С.М. Ляпунов, А.В. Горбунов, О.И. Окина, М.В. Фронтасьева // Проблемы биогеохимии и геохимической экологии. – 2010. – № 1(12). – С. 155–163.
3. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология. – 2007. – Вып. 3(12). – С. 6–26.
4. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М.: Изд-во КДУ, 2007. – 140 с.
5. Finkel T., Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging // Nature. – 2000. – Vol. 408. – P. 239–247.
6. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – Vol. 125(1). – P. 189–198.
7. Kabala C., Singh B.R. Fractionation and Mobility of Copper, Lead, and Zinc in Soil Profiles in the Vicinity of a Copper Smelter // J. Environ. Qual. – 2001. – № 30. – P. 485–492.
8. Kumar G.N., Knowles N.R. Changes in Lipid Peroxidation and Lipolytic and Free-Radical Scavenging Enzyme during Aging and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Seed-Tubers // Plant Physiol. – 1993. – Vol. 102. – P. 115–124.
9. Lichtentaller H.K., Welburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // Biochem. Soc. Trans. – 1983. – Vol. 11, № 6. – P. 591–592.
10. Scandalios J.G. The rise of ROS // Trends Biochem. Sci. – 2002. – Vol. 27. – P. 483–486.

Рецензенты:

Кособрюхов А.А., д.б.н., с.н.с., руководитель группы экологии и физиологии фототрофных организмов Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, г. Пушкино;

Субботина Т.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой медико-биологических дисциплин Тульского государственного медицинского института, г. Тула.

Работа поступила в редакцию 02.11.2011.