

Arkadiusz Telesiński*, Beata Smolik*, Natalia Skrzypiec*, Janina Nowak*

**KSZTAŁTOWANIE SIĘ AKTYWNOŚCI KATALAZY I PEROKSYDAZY NA
TLE ZMIAN ZAWARTOŚCI FLUORKÓW W ROŚLINACH FASOLI PO
WPROWADZENIU DO GLEBY RÓŻNYCH DAWEK NaF**

**THE FORMATION OF CATALASE AND PEROXIDASE ACTIVITY AGAINST
THE BACKGROUND OF CHANGES OF FLUORIDE CONTENT IN BEAN
PLANTS AFTER ADDITION OF DIFFERENT DOSES OF NaF TO SOIL**

Słowa kluczowe: fluorki, katalaza, peroksydaza, fasola.

Key words: fluoride, catalase, peroxidase, bean.

The subject of presented study was the influence of NaF addition to soil on the fluoride content and antioxidant enzymes (catalase and peroxidase) activity in bean plants. The laboratory pot experiment was carried out on samples of light silty loam containing 1.2% of humus. Pots were filled with 1 kg soil samples each, to which NaF solution was added in doses 10, 30 and 50 mM · kg⁻¹. Each pot was seeded with 6 seeds of bean cv. Aura. The plants grown in soil without NaF were control. On days 14, 21 and 28 green parts of plants were collected for determination of catalase and peroxidase by colorimetry as well as fluoride content by potentiometry. Obtained results show that addition of NaF to soil caused increase in catalase and peroxidase activity and fluoride content in plants. The highest antioxidant enzymes activity was in plants growing in soil with 50 mM NaF · kg⁻¹. Catalase activity was also significantly positively correlated with fluoride content in plants. This results show that the fluoride could be a stress factor for bean plants.

1. WPROWADZENIE

Metabolizm tlenowy dostarcza organizmom aerobowym więcej energii w porównaniu z metabolizmem beztlenowym u anaerobów, lecz stopniowa redukcja O₂ do H₂O może prowadzić

* *Dr inż. Arkadiusz Telesiński, dr inż. Beata Smolik, mgr inż. Natalia Skrzypiec, prof. dr hab. Janina Nowak – Katedra Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin; tel.: 91 449 62 82; e-mail: beata.smolik@zut.edu.pl*

do powstawania reaktywnych form tlenu [Karsznicka i Grzesik 2004, Małecka i Tomaszewska 2005]. W warunkach fizjologicznych wytwarzane są niewielkie ilości reaktywnych form tlenu (RFT). Uczestniczą one w wielu procesach komórkowych [Gałecka i in. 2008], które Łata [1998] nazywa niepożądanymi, lecz nieuchronnymi produktami ubocznymi metabolizmu tlenowego.

Nadmierna ilość reaktywnych form tlenu, przekraczająca pojemność komórkowych mechanizmów obronnych, jest powodem występowania stresu oksydacyjnego u organizmów [Skrzypek i Dubert 1997, Gałecka i in. 2008]. Może to doprowadzić do metabolicznych dysfunkcji i w ostateczności do śmierci komórki [Becana i in. 1998].

Podwyższeniu poziomu RFT sprzyjają różnorodne stresy środowiskowe, takie jak: wysoka temperatura, zasolenie, promieniowanie UV, metale ciężkie, ksenobiotyki czy patogeny [Bartosz 1997]. Jednym z pierwiastków odgrywających ogromną rolę w procesach wolnorodnikowych jest fluor [Chlubek i in. 2001]. Działanie fluoru na roślinę można rozpatrywać z dwóch punktów widzenia:

- jako wpływ fluoru zawartego w pyłach i gazach przemysłowych na roślinę oraz
- jako wpływ tego pierwiastka podczas jego pobierania przez system korzeniowy.

Oddziaływanie fluoru na roślinę przez system korzeniowy jest słabo poznane [Skupień-Wysocka i Cholewiński 1995].

Do reaktywnych form tlenu należą rodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz tlen singletowy (1O_2). Organizmy wytworzyły wiele mechanizmów chroniących je przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu. System antyoksydacyjny składa się zarówno ze związków niskocząsteczkowych: askorbinianu, glutationu, β -karotenu, α -tokoferolu, cysteiny, jak i enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy oraz katalazy [Malenić i in. 2003, Małecka i Tomaszewska 2005].

2. CEL I METODY BADAŃ

Celem podjętych badań było określenie wielkości kumulacji fluoru w tkankach roślinnych oraz zmian w nich aktywności katalazy i peroksydazy w zależności od zawartości w glebie fluoru.

Przeprowadzono doświadczenie na glinie pylastej lekkiej o zawartości próchnicy 1,2%. Pobraną z pola glebę przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm i doprowadzono jej wilgotność do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Następnie glebę podzielono na 1 kg naważki, którymi, po wcześniejszym dodaniu wodnych roztworów NaF w dawkach 10, 30 i 50 $mM \cdot kg^{-1}$, napełniono wazony. Do każdego wazonu wysiano po 6 nasion fasoli odmiany Aura. Próbę kontrolną stanowiły rośliny rosnące na glebie bez dodatku soli.

W trakcie trwania doświadczenia rośliny były oświetlane lampą sodową Son-T Agro 400 W firmy Philips, o natężeniu promieniowania na poziomie gleby w wazonach 90 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ PAR (radiacji aktywnej fotosyntetycznie). Fotoperiodyzm został ustalony na 12 godzin dnia i nocy.

W czternastym, dwudziestym pierwszym i dwudziestym ósmym dniu doświadczenia pobierano zielone części roślin i oznaczano w nich kolorymetrycznie, przy użyciu spektrofotometru UV/VIS Lambda Bio firmy Perkin Elmer, aktywność katalazy metodą Lücka [1963] i peroksydazy metodą Chance'a i Maehly'ego [1955] oraz potencjometrycznie, za pomocą pH-jonometru Orion 920A z jonoselektywną elektrodą fluorkową, zawartość fluorków zgodnie z procedurą Szymczak i Grajety [1982].

Doświadczenie przeprowadzono w układzie kompletnej randomizacji, w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji. Najmniejsze istotne różnice obliczono według procedury Tukey'a przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Analizy wykonano niezależnie w każdym terminie pomiaru dla każdej badanej kombinacji. Wyliczono również współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy zawartością F^- w roślinach a aktywnością w nich badanych enzymów.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

W roślinach rosnących na glebie bez dodatku NaF zawartość fluorków mieściła się w granicach $7,923\text{--}11,856 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. rośliny (tab. 1). Wraz ze wzrostem zawartości fluorku w glebie, jak i w poszczególnych dniach doświadczenia zwiększała się koncentracja fluorków w tkankach roślinnych.

Największy wzrost zawartości F^- zaobserwowano między 21 a 28 dniem doświadczenia, przy stężeniu 50 mM NaF – ok. 3,5 razy większy. Również bardzo duży wzrost w porównaniu z zawartością fluorków w roślinach kontrolnych – ponad dziesięciokrotnie większy stwierdzono w 28 dniu pomiaru przy dawce 50 mM .

Tabela 1. Zmiany zawartości fluorków w roślinach fasoli w zależności od dawki wprowadzonego do gleby NaF

Table 1. Changes of fluoride content in bean plants depending on the NaF doses added to soil

Dzień doświadczenia	Ilość NaF [$\text{mM} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{gleby}}$]			
	0 (kontrola)	10	30	50
$\mu\text{M F}^- \cdot \text{g}^{-1}_{\text{ś.m. rośliny}}$				
14	$7,923 \pm 0,171$	$12,255 \pm 0,209$	$27,056 \pm 0,342$	$34,371 \pm 0,437$
21	$11,457 \pm 0,190$	$12,293 \pm 0,114$	$26,942 \pm 0,190$	$35,036 \pm 0,209$
28	$11,856 \pm 0,133$	$13,490 \pm 0,228$	$42,864 \pm 0,627$	$148,789 \pm 1,216$

Podobną tendencję akumulacji jonów fluorkowych w tkankach roślinnych pod wpływem zwiększających się koncentracji NaF w glebie zaobserwowali Skupień-Wysocka i Cholewiński [1998] w pędach siewek grochu, jak również Pushnik i Miller [1999] w roślinach kukurydzy i Sharma [1985] w roślinach kapusty, fasoli i pszenicy. Nowak i in. [2003] zauważyli natomiast, istotną korelację między zawartością fluoru rozpuszczalnego w roztworze glebowym a zawartością tego pierwiastka w roślinach sałaty.

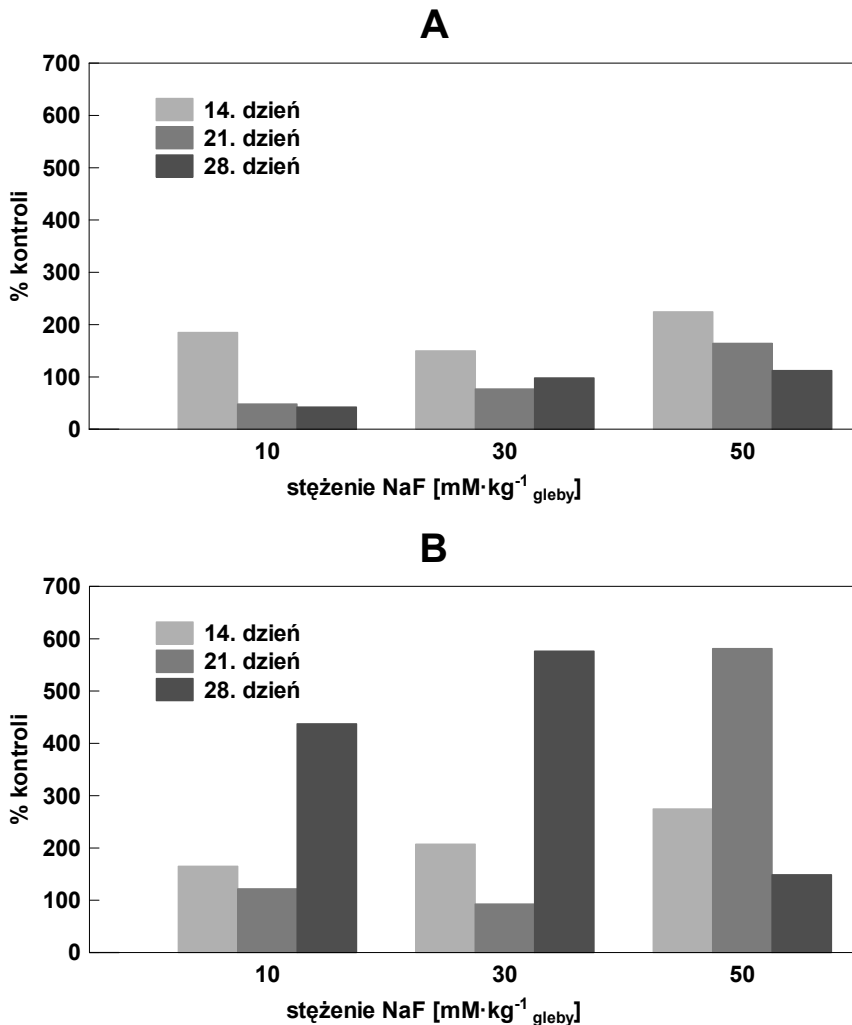
Dodatek do gleby NaF spowodował istotne zmiany aktywności oznaczanych enzymów oksydoredukcyjnych w roślinach fasoli (tab. 2). Jeżeli chodzi o katalazę początkowo stwierdzono wyraźne zwiększenie aktywności tego enzymu przy wszystkich dawkach NaF, które utrzymywało się w czasie trwania doświadczenia jedynie w roślinach rosnących w glebie z dodatkiem 50 mM NaF. Dodatek do gleby NaF w dawce 10 i 30 mM w 21. i 28. dniu doświadczenia spowodował natomiast obniżenie aktywności katalazy. Natomiast aktywność peroksydazy w trakcie trwania całego doświadczenia była stymulowana po wprowadzeniu do gleby wszystkich dawek NaF. W większości przypadków zaobserwowana aktywacja peroksydazy zwiększała się w kolejnych terminach pomiarów.

Tabela 2. Zmiany aktywności enzymów oksydoredukcyjnych w roślinach fasoli w zależności od dawki wprowadzonego do gleby NaF

Table 2. Changes of antioxidant enzymes activity in bean plants depending on the NaF doses added to soil

Dzień doświadczenia	Ilość NaF [$\text{mM} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{gleby}}$]				NIR _{0,05}
	0 (kontrola)	10	30	50	
Aktywność katalazy [$\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \cdot (\text{g s.m. rośliny} \cdot \text{min})^{-1}$]					
14	1,086	2,010	2,162	2,438	0,132
21	2,590	1,252	1,990	4,246	0,240
28	2,520	0,957	2,207	2,529	0,213
Aktywność peroksydazy [μM purpurogaliny $\cdot (\text{g s.m. rośliny} \cdot 4 \text{ min})^{-1}$]					
14	0,463	0,765	0,960	1,271	0,183
21	0,659	0,804	0,612	3,828	0,096
28	0,610	2,669	3,514	0,908	0,123

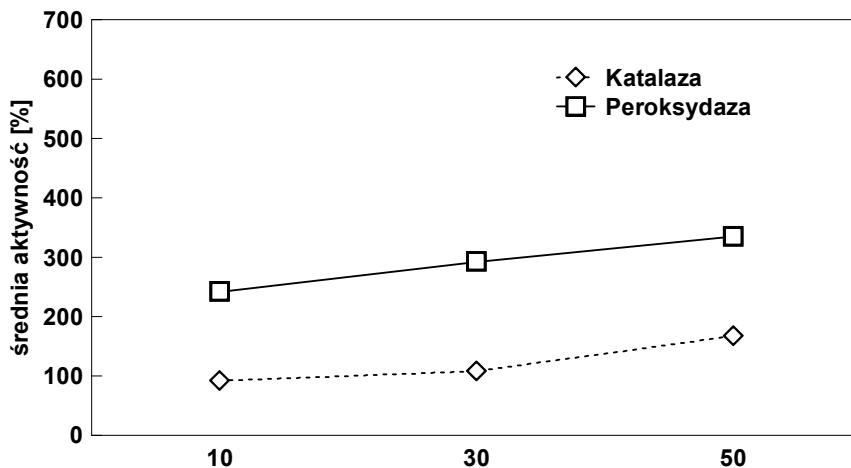
Największa stymulacja aktywności tego enzymu w roślinach rosnących w glebie z dodatkiem 10 i 30 mM NaF została odnotowana w ostatnim terminie pomiarów i wynosiła odpowiednio ok. 480% i 570% aktywności w roślinach kontrolnych. W roślinach natomiast rosnących w glebie z dodatkiem 50 mM NaF największą aktywację (ok. 580% aktywności w roślinach kontrolnych) stwierdzono w 21 dniu doświadczenia (rys. 1).



Rys. 1. Procentowe zmiany aktywności katalazy (A) i peroksydazy (B) w roślinach fasoli w zależności od dawki wprowadzonego do gleby NaF

Fig. 1. Percentage changes of catalase (A) and peroxidase (B) activity in bean plants depending on the NaF doses added to soil

Analizując średnią procentową aktywność badanych enzymów wykazano, że zwiększa się ona wraz ze wzrostem stężenia NaF w glebie: w przypadku katalazy od ok. 91% przy 10 mM NaF do ok. 165% aktywności w roślinach kontrolnych przy 50 mM NaF, a w przypadku peroksydazy od ok. 240% przy 10 mM NaF do ok. 335% aktywności w roślinach kontrolnych przy 50 mM NaF (rys. 2).



Rys. 2. Średnia procentowa aktywność katalazy i peroksydazy w roślinach fasoli w zależności od dawki wprowadzonego do gleby NaF

Fig. 2. Mean percentage activity of catalase and peroxidase in bean plants depending on the NaF doses added to soil

Zaobserwowane zmiany aktywności katalazy i peroksydazy mogą być spowodowane zwiększoną produkcją w roślinach fasoli reaktywnych form tlenu. O aktywacji peroksydazy w roślinach grochu pod wpływem NaF, zwiększającej się wraz ze wzrostem stężenia soli w pożywce, donoszą także Skupień-Wysocka i Cholewiński [1995]. Dane o wzroście aktywności katalazy i peroksydazy pod wpływem związku fluoru w siewkach grochu ci sami autorzy podają w badaniach przeprowadzonych w 1998 r. [Skupień-Wysocka i Cholewiński 1998], gdzie najwyższą aktywność peroksydazy obserwowano przy stężeniu $33 \text{ mg F}^- \cdot \text{dm}^{-3}$. Wzrost aktywności peroksydazy pod wpływem fluoru zaobserwował również Lhoste [1979] w młodych pędach tytoniu.

Obliczone współczynniki korelacji wykazały, że istniała istotna dodatnia zależność pomiędzy zawartością w tkankach roślinnych a aktywnością w nich katalazy (tab. 3). Telesiński i in. [2008] wykazali, że zarówno aktywność katalazy, jak i aktywność peroksydazy w roślinach fasoli, była istotnie dodatnio skorelowana z zawartością w nich jonów chlorkowych.

Tabela 3. Współczynniki korelacji liniowej pomiędzy zawartością F⁻ a aktywnością katalazy i peroksydazy w roślinach fasoli rosnących na glebie z dodatkiem NaF

Table 3. Pearson linear correlation coefficient between fluoride content and activity of catalase and peroxidase in bean plant growing in soil with NaF

	Aktywność katalazy	Aktywność peroksydazy
Zawartość F ⁻	0,50*	0,07

Objaśnienie: * – istotne na poziomie $p=0,05$.

4. WNIOSKI

1. Dodatek do gleby NaF spowodował wyraźne zwiększenie aktywności katalazy i peroksydazy oraz koncentracji fluorków w roślinach fasoli wraz ze wzrostem stężenia tej soli.
2. Największe zmiany aktywności katalazy i peroksydazy spowodował dodatek do gleby NaF w stężeniu 50 mM·kg⁻¹.
3. Zawartość w glebie fluoru może być przyczyną powstania stresu oksydacyjnego w roślinach fasoli, czego wyrazem jest podwyższona aktywność enzymów antyoksydacyjnych.

PIŚMIENNICTWO

- BARTOSZ G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 19: 47–64.
- BARTOSZ G. 2006. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa.
- BECANA M., MORAN J.F., ITURBE-ORMAETXE I. 1998. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant Soil* 2001: 137–147.
- CHANCE B., MAEHLY S.K. 1955. Assay of catalase and peroxidases. *Meth. Enzymol.* 2: 764–775.
- CHLUBEK D., STACHOWSKA E., BOBER J. 2001. Udział fluorków w reakcjach wolnorodnikowych i ich wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 34(3): 263–266.
- GAŁECKA E., JACEWICZ R., MROWICKA M., FLORKOWSKI A., GAŁECKI P. 2008. Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości i funkcje. *Pol. Merk. Lek.* 25(147): 266–268.
- KARSZNICKA A.M., GRZESIK M. 2004. Starzenie się nasion i mechanizmy obronne przed stresem oksydacyjnym. *Post. Nauk Rol.* 51(1): 19–34.
- LHOSTE A.M. 1979. The effect of fluoride on the polyphenoloxidase and peroxidase activities of tobacco leaves (*Nicotina tabacum*). *Fluoride* 1(12): 33–38.
- LÜCK H. 1963. Catalase. w: *Methods of enzymatic analysis* (red. Bergmeyer H.-U.). Wyd. Verlag Chemie, Nowy Jork i Londyn: 885–888.
- ŁATA B. 1998. Mechanizmy chroniące roślinę przed stresem oksydacyjnym, wywołanym niekorzystnymi warunkami środowiska. *Post. Nauk Rol.* 6: 115–130.
- MALENĆIĆ D., POPOVIĆ M., MILADINOVIĆ J. 2003. Stress tolerance parameters in different genotypes of soybean. *Biol. Plant.* 46(1): 141–143.
- MAŁECKA A., TOMASZEWSKA B. 2005. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post. Biol. Kom.* 2: 311–325.
- NOWAK J., ZAKRZEWSKA H., MARCINIĄK Ź., SMOLIK B. 2003. Obieg fluoru w łańcuchu troficznym. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 492: 249–256.

- PUSHNIK J.C., MILLER G.W. 1999. The influences fluoride on the physiology and metabolism of higher plants. *Fluoride* 1(23): 5–19.
- SHARMA H.C. 1985. Effect of hydrogen fluoride fumigation in *Triticum aestivum*, *Brassica juncea* and *Phaseolus aureus* plants. *Fluoride* 1(18): 15–22.
- SKRZYPEK E., DUBERT F. 1997. Stres oksydacyjny w kulturach tkankowych bobiku (*Vicia faba* ssp. *Minor*). *Zesz. Nauk. AR im. H. Kołłątaja w Krakowie* 318: 393–399.
- SKUPIEŃ-WYSOCKA K., CHOLEWIŃSKI A. 1995. Wpływ fluorku na aktywność wybranych enzymów i zawartość barwników chloroplastowych w liściach grochu. *Zesz. Nauk. AR Szczecin*. 167: 119–129.
- SKUPIEŃ-WYSOCKA K., CHOLEWIŃSKI A. 1998. Ocena wpływu fluorku sodowego na kiełkowanie i aktywność wybranych enzymów w siewkach grochu. *Metab. Fluoru* 8: 174–177.
- SZYMCZAK J., GRAJETA H. 1982. Zawartość fluoru w produktach roślinnych z terenów przemysłowych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 15(1/2): 47–51.
- TELESIŃSKI A., NOWAK J., SMOLIK B., DUBOWSKA A., SKRZYPIEC N. 2008. Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *J. Elementol.* 13(3): 401–409.