

Оксана ЩЕРБАЧЕНКО, Орест ДЕМКІВ, Володимир КОЗЛОВСЬКИЙ

НАГРОМАДЖЕННЯ І РОЗПОДІЛ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У КЛІТИНАХ ГАМЕТОФІТУ МОХІВ

*Встановлено високий рівень нагромадження мохом *Drepancladus aduncus* іонів важких металів (Cd^{2+} , Pb^{2+} і Cu^{2+}) із розчинів 1,0-10,0 мкмоль/л. Аналізуючи розподіл поглинутих іонів у клітинах, з'ясували, що ~87% Pb^{2+} , ~68% Cu^{2+} і ~96% Cd^{2+} локалізовано внутрішньоклітинно. Компонентами клітинних стінок затримувалось ~13% іонів свинцю, ~32% іонів міді і ~4% іонів кадмію. Може бути, що різниця у розподілі іонів у клітинах гаметофіту мохів є визначальною для вищої токсичності кадмію, ніж свинцю і міді, а також зумовлює відсутність їх десорбції. Обґрунтовано можливість застосування моху *D. aduncus* для розробки біологічних методів діагностики й очищення забруднених екотопів.*

Стрімке зростання обсягів промислового виробництва, транспортного навантаження спричинює забруднення природного середовища немічними елементами, передусім важкими металами (ВМ). Позаяк ВМ можуть бути біологічно активними і, включаючись у біологічний кругообіг, акумулюватися у ґрунті та воді — це створює несприятливі умови для мінерального живлення рослин, а відтак призводить до інтоксикації тварин і людини.

Захист рослин від токсичної дії ВМ здійснюється регуляцією поглинання і акумуляції як на рівні цілого організму, органів, тканин, так і детоксикацією металу на внутрішньоклітинному рівні [9; 23]. Здатність нагромаджувати ВМ зумовлена морфологічними й екологічними особливостями досліджуваного виду, віком культури, сезонною динамікою температури й освітлення середовища [17]. Кількість металу, яку організм може акумулювати, залежить від співвідношення метал/біомаса, тривалості інкубації, складу і концентрації іонів у середовищі [20].

У ролі біологічних індикаторів, які чутливо реагують на зміни середовища (насамперед ВМ) та дають змогу виявляти рівень його забруднення, використовують різні групи організмів (бактерії, базидіомицети, водорості, лишайники, молюски та ін.) [2]. Мохи проаналізовані значно слабше, хоча саме у них вплив важких металів виявляється набагато контрастніше. Бріофіти як безсудинні рослини, на відміну від інших представників вищих рослин, поглинають мінеральні речовини всією поверхнею тіла, завдяки чому нагромаджують полютанти, у тому й радіоактивні елементи та ВМ, у підвищених концентраціях і не виробили ніяких механізмів дискримінації щодо надмірного поглинання токсичних

речовин [7, 1, 8, 5, 22, 24]. Однак природа сорбційних властивостей мохів залишається маловивченою, як і розподіл поглинутих металів між окремими компартментами клітин. Зокрема, важливими є дослідження здатності клітинних стінок зв'язувати іони ВМ та запобігати їх проникненню у цитозоль як один з механізмів металостійкості рослин.

У зв'язку з цим наше дослідження мало за мету вивчення особливостей нагромадження і зовнішньо- та внутрішньоклітинного розподілу іонів ВМ у гаметофіті моху *D. aduncus* залежно від їх концентрацій у розчинах, оцінити можливість використання моху для діагностики рівнів забруднення й очищення забруднених екотопів.

Об'єктом досліджень був гігрофітний мох *Drepanocladus aduncus* (Hedw) Warnst., який виростили у лабораторії регенерацією гаметофіту із зразків, зібраних в околицях м. Львова. В дослідях використовували непошкоджені, без відмерлих частин верхівки пагонів моху довжиною 2–3 см. Для аналізу поглинальної здатності моху пагони експонували в розчинах 1,0–100,0 мкмоль/л $Pb(NO_3)_2$, $Cu(SO_4)_2$, $CdCl_2$ упродовж 24 год, після чого промивали дистильованою водою і визначали вміст ВМ у рослинах та розчинах атомно-адсорбційним методом. Поглинальну здатність моху оцінювали за показником статичної обмінної ємності (СОЄ):

$$COE = (C_{ВИХ.} - C_{КІН.}) \cdot V/m,$$

де $C_{ВИХ.}$ і $C_{КІН.}$ — вихідна і кінцева концентрації іонів металу в розчині, мг/мл; V — об'єм розчину, мл; m — маса наважки моху, мг/г сухої речовини.

Для аналізу здатності гаметофіту *D. aduncus* внутрішньо- та міжклітинно розподіляти іони ВМ мох експонували в розчинах 10,0 мкмоль/л $Pb(NO_3)_2$, $CdCl_2$ і $Cu(SO_4)_2$ упродовж 2 год. за кімнатної температури, після чого зразки промивали дистильованою водою. Вимивання поглинутих елементів проводили у 2 етапи: 1) з клітинних стінок; 2) з цитозолу. Для вимивання поверхнево-зв'язаних катіонів свинцю та міді зразки занурювали на 30 хв у 20 ммоль/л розчин ЕДТА і у 20 ммоль/л розчин $NiCl_2$ для вимивання катіонів кадмію. Після першого етапу рослини висушували в сушильній шафі за температури 80°C упродовж 16 год для визначення сухої маси відмитих рослин. Для вимивання іонів важких металів з цитозолу клітин висушені зразки занурювали в 1 М HNO_3 і двічі промивали по 30 хв, постійно струшуючи зразки. Рослини повторно висушували, як описано раніше, для визначення їх сухої маси. За різницею цих мас оцінювали масу цитозолу і масу клітинної стінки [14].

Вміст ВМ у рослинах та розчинах визначали атомно-адсорбційним методом на спектрофотометрі „С-115М1” (Україна, „Селмі“) в пропан-бутановому полум'ї з використанням електротермічного атомізатора „Графіт-2” (Україна, „Селмі“). Розчини не фільтрували, щоб запобігти втраті елементів [6]. Контролем були рослини, які експонували у водному розчині без ВМ. Усі аналізи проводили в чотирикратній повторності, цифровий матеріал опрацьовували статистично [4].

Унаслідок проведених досліджень встановлено, що вміст ВМ у пагонах моху *D. aduncus* зростає пропорційно до концентрацій у розчинах, але зростання було некратне. Нагромадження іонів ВМ у рослинах визначається величиною іонообмінного коефіцієнта СОЄ,

розрахунок якого показав збільшення його значень при зростанні концентрацій металів у розчинах (таблиця).

Нами виявлено, що 1 г моху *D. aduncus* поглинав з 1 мкмоль/л розчину $Pb(NO_3)_2$ 57,9% Pb^{2+} , з 10,0 мкмоль/л — 82,6% Pb^{2+} , натомість з 100,0 мкмоль/л — лише 42,8% Pb^{2+} . Подібні результати отримали й у дослідах з кадмієм: 81,8 %, 95,5 % і 68,6 % Cd^{2+} відповідно. Найслабше пагони моху нагромаджували з розчинів мідь: 63,5 % Cu^{2+} з 1 мкмоль/л, 49,2 % Cu^{2+} з 10,0 мкмоль/л і 42,8 % Cu^{2+} з 100,0 мкмоль/л. Імовірно, це зумовлено тим, що мідь належить до складу необхідних для росту й розвитку рослин мікроелементів і поряд із сорбцією відбувається утилізація рослинами її катіонів. Отже, найвищий рівень нагромадження у пагонах *D. aduncus* припадав на 1,0—10,0 мкмоль/л концентрації металів у розчинах. За вмістом у пагонах метали розподілялися у такій послідовності: $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Cu^{2+}$. Можливо, це пов'язано з різними клітинними механізмами нагромадження ВМ [12]. Відомо, що у транспортуванні міді можуть брати участь як неспецифічні механізми (іонні канали, редуктазні системи), характерні для всіх інших мікроелементів, так і специфічні. До них належать перенесення міді в комплексі з нікотинаміном і наявність Cu^{2+} -АТФаз, які забезпечують транспортування міді через плазмалему [11]. Для кадмію і свинцю специфічні механізми поглинання малодосліджені. Вважають [25], що в більшості випадків Cd^{2+} і Pb^{2+} проникають у клітину внаслідок іонообмінних процесів. Відомо [10; 19], що ВМ, передусім Cd^{2+} , індукують синтез фітохелатинів, які визначають металостійкість рослин.

Таблиця

Поглинання іонів важких металів пагонами моху *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst.

Концентрації солей металів, мкмоль/л	Свих розчину, мг/мл	СОЕ, мг/г сух. р.	С _{кпн.} розчину, мг/мл
0 (Контроль)	0	≥0,005	≥0,005
$Pb(NO_3)_2$			
1,0	0,207	0,14±0,03	0,06±0,004
10,0	2,070	1,71±0,21	0,35±0,02
100,0	20,70	8,87±0,39	11,82±0,54
$CdCl_2$			
1,0	0,11	0,09±0,05	0,02±0,001
10,0	1,12	1,07±0,23	0,05±0,001
100,0	11,2	5,49±0,61	5,71±0,44
$Cu(SO_4)_2$			
1,0	0,063	0,04±0,001	0,023±0,003
10,0	0,63	0,31±0,04	0,32±0,01
100,0	6,3	2,81±0,12	3,49±0,3

Мохи як безсудинні рослини поглинають воду та мінеральні речовини не лише з ґрунту, а й з повітря та опадів і не виробили дискримінаційних механізмів відбору тих чи інших елементів, тому важливою є інформація про розподіл поглинутих іонів ВМ у їх клітинах. ВМ у мохах можуть бути: а) як звичайне поверхнєве забруднення пагонів; б) фізико-хімічно зв'язаними компонентами клітинних стінок; в) хелатованими всередині

клітин [13]. Перший етап поглинання мінеральних елементів, у тому й ВМ, рослинами зумовлений фізико-хімічними процесами в апопласті, тобто дифузією і зв'язуванням іонів з компонентами клітинних стінок. Подальший перехід іонів у симпласт має більш вибіркового характеру.

Е. Небоер та Д. Річардсон [21] запропонували класифікацію катіонів за спорідненістю до аніонних лігандів клітинної стінки: до О-вмісних лігандів (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), до N- та S-вмісних лігандів (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} та Hg^{2+}) і до обох типів аніонних лігандів. У клітинних стінках мохів переважають О-вмісні карбоксильні групи пектинів, хоча в деяких мохів наявні аніонні ділянки з N- і S-місткими лігандами, можливо, протеїнової природи, які усередині матриксу клітинної стінки або на поверхні плазматичної мембрани [15]. Нагромадження іонів у вільному просторі клітинних стінок залежить від кількості гістидильних груп білків, а також карбоксильних груп, що входять до складу пектинів. Карбоксильні групи утворюють на поверхні пектинів певний заряд, який утримує іони металів. Отже, зовнішньоклітинне зв'язування є одним з механізмів, які частково запобігають проникненню іонів ВМ у цитозоль, що впливає на загальний функціональний стан рослинного організму.

Застосовуючи метод послідовної елюції (вимивання) катіонів Д. Брауна та Дж. Уелса [14], нами проаналізовано розподіл іонів Pb^{2+} , Cu^{2+} і Cd^{2+} у клітинах моху *D. aduncus* і встановлено співвідношення між кількістю катіонів, локалізованих зовнішньо- і внутрішньоклітинно. Виявлено, що у клітинних стінках *D. aduncus* затримувалося ~13% Pb^{2+} , ~32% Cu^{2+} і ~4% Cd^{2+} від загальної кількості поглинутих катіонів. Це свідчить про те, що Cu^{2+} найміцніше зв'язуються з компонентами клітинних стінок, а отже, і повільніше пересуваються по апопласту, порівняно з Pb^{2+} та Cd^{2+} . У цитозолі клітин вміст ВМ становив ~87% Pb^{2+} , ~68% Cu^{2+} і ~96% Cd^{2+} (рис.).



Рис. Зовнішньо- та внутрішньоклітинне зв'язування іонів важких металів у пагонах моху *D. aduncus*: 1 — свинцю, 2 — міді, 3 — кадмію.

Передовсім такий розподіл катіонів у клітинах моху *D. aduncus* пов'язаний із фізико-хімічними властивостями металів (електронегативністю, схильністю до комплексоутворення й стійкістю халатів,

спорідненістю до певних хемічних груп і біологічною доступністю) і може бути визначальним для вищої токсичності кадмію, ніж свинцю та міді, а також зумовлювати відсутність їх десорбції. Однак може бути, що активне поглинання іонів кадмію спричинене його вищою рухливістю і для його перенесення залучені так звані Р-помпи плазмалеми, тобто Ca^{2+} -АТФази і/або інші системи активного транспортування [18].

Тривалість часу проникнення катіону характеризує кінетику насичення металу, яка варіює для різних організмів. Д. Браун та Дж. Уелс [14; 15] експериментально встановили, що 30 хвилин достатньо для цілковитого поглинання кадмію з розчину 0,1 мкмоль/л концентрації металу, хоча насичення у природі триває значно довше — протягом декількох днів і за нижчих концентрацій. Подібні результати одержані і в дослідях з іншими рослинами [3; 16]. Автори встановили, що процес поглинання кадмію має двохфазний характер. Перша стадія — швидка, початкова, яка відображає процес зв'язування Cd^{2+} з компонентами апопласта (триває ~ 30 хв), протягом якої поглинається майже 80% металу із субстрату. Подальша стадія насичення — повільна, яка реалізується внаслідок транспортування Cd^{2+} через плазмалему всередину клітини і може тривати декілька днів. Можливо, неоднакова швидкість поглинання ВМ мохом *D. aduncus* і є причиною різного рівня нагромадження їх катіонів із розчинів.

На підставі проведених досліджень встановлено, що *D. aduncus* властивий високий рівень акумуляції ВМ, які імібілізуються переважно внутрішньоклітинно. Частина іонів зв'язується на зовнішньоклітинних сайтах, що частково запобігає проникненню ВМ у цитозоль і може впливати на загальний функціональний стан рослинного організму. Виявлені нами особливості нагромадження і розподілу ВМ на поверхні клітинних стінок та всередині клітин моху, на нашу думку, треба враховувати у фізіолого-біохемічних дослідженнях та під час розроблення біологічних методів діагностики і очищення забруднених екотопів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бардунов Л. В. Основные аспекты применения мохообразных // Ботан. журн., 1989. — 74, — № 3. — С. 414—416.
2. Вінниченко О. М., Долгова Л. Г. Екофізіологічні проблеми фітоценозів та біологічна активність едафотопів в умовах техногенних територій // Фізіологія рослин на межі тисячоліть. 2001. — Т. 2. — С. 23—37.
3. Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохим. культ. раст. 1994. — 26, — № 2. — С. 107—116.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. Шк., 1990. — 352 с.
5. Маевська С. М. Морфо-фізіологічні аспекти стійкості мохів до токсичної дії іонів важких металів // Автореф. дис. ... на здобуття наук. ступ. канд. біолог. наук. — Львів, 2001. — 21 с.
6. Методические рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. — М.: Гидрометеоздат, 1981. — 80 с.
7. Парибок Т. А. Загрязнение растений металлами и его эколого-физиологические последствия // Растения в экстремальных условиях mine раль-

ного питания / Под ред. М. Я. Школьника, Н. В. Алексеевой-Поповой. — Л.: Наука, 1983. — С. 82—100.

8. Речевська Н. Я. Адаптація мохів до токсичної дії важких металів // Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. — Львів, 1999. — 17 с.

9. Тарабрин В. П., Пельтихина Р. И. Адаптивные механизмы растений к избыточному содержанию металлов // Интродукция и акклиматизация растений. 1983. — Вып. 3. С. 55—60.

10. Феник С. И., Трофимьяк Т. Б., Блюм Я. Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Усп. совр. биол. 1995. — 115, — Вып. 3. — С. 261—275.

11. Юрин В. М., Соколик А. И., Кудряшов А. П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. — Минск: Наука и техника, 1991. — 272 с.

12. Assche F., Clijsters H. Effect of metals on enzyme activity in plants // Plant, Cell and Environment. 1990. — 113. — P. 195—206.

13. Brown D. H. Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring / In A. F. Dyer and G. Duckett (eds.): The experimental biology of bryophytes. — New York: Academic Press, 1984. — P. 247—258.

14. Brown D. H., Wells J. M. Sequential elution technique for determining the cellular location of cations / In: Glime J., ed. Methods in Bryology. Proceedings of the Bryological Methods Workshop, Mainz. Nichinan: Hattori Botanical Laboratory, 1988. — P. 227—233.

15. Brown D. H., Wells J. M. The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemicals by bryophytes / Bryophytes: their chemistry and chemical taxonomy. — Oxford: Clarendon Press, 1990a. — P. 319—335.

16. Cataldo D. A., Garland T. R., Wildung R. E. Cadmium distribution and chemical fate in soybean plants // Plant Physiol. 1991. — Vol. 68. — N 4. — P. 835—839.

17. Ernst W. Physiological and biochemical aspects of metal tolerance // Effects of air pollutants of plants. — Cambridge etc. 1976. — P. 115—133.

18. — Cadmium absorption by rise plant. 1. Mode of the absorption // Soil. Sci. and Plant Nutr. 1989. — Vol. 25. — № 3. — P. 407—415.

19. Grill E. Schutz der Pflanzen vor Schwermetallen // Jahrb. Acad. Wiss. Gottingen Jahr., 1989. Gottingen, 1990. — P. 21—24.

20. Mouvet C. Accumulation et relargage de plomb, zinc, cadmium, chrome et cuivre par des mousses aquatiques en milieu naturel et au laboratoire. Intern. Report. Laboratoire d' Ecologie, Université de Metz. 1987. — P. 1—122.

21. Nieboer E., Richardson D. H. S. The replacement of the condescript term „heavy metal“ by a biologically and chemically significant classification of metal ions // Environmental Pollution. 1980. Series B. — № 3. — P. 3—26.

22. Onianwa P. C. Monitoring atmospheric metal pollution: a review of the use of mosses as indicators // Environ. Monit. Asses. 2001. — Vol. 71. — № 1. — P. 13—50.

23. Peterson P. J. Adaptation to toxic metals // Metals and micronutrients: Uptake and utilization by plants // Ed. D. A. Robb, W. S. Pierpoint. — New York: Acad. Press, 1983. — P. 51—69.

24. Reimann C., Niskavaara H., Kashulina G. et al. Critical remarks on the use of terrestrial moss (*Hylocomnium splendens* and *Pleurozium schreberi*) for monitoring of airborne pollution // Environ. Pollut. 2001. — Vol. 113. — № 1. P. 41—57.

25. Salt D. E., Blaylock M., Kumar N. P. et al. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment. Using plants // Biotechnology. 1995. — 13. — P. 468—474.

SUMMARY**Oksana SHCHERBACHENKO, Orest DEMKIV, Volodymyr KOZLOVSKY****ACCUMULATION AND DISTRIBUTION OF HEAVY METALS IONS
IN CELLS OF MOSSES GAMETOPHYTE**

In the moss *Drepanocladus aduncus* the high level of heavy metals ions (Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+}) accumulation from 1,0-10,0 $\mu m/1$ solutions has been established. The analysis of absorbed ions has shown that ~87% Pb^{2+} , ~68% Cu^{2+} and ~96% Cd^{2+} were localized inside a cell, ~13% of lead ions, ~32% of copper ions and ~4% cadmium ions being kept by components of cell' walls. It can not be excluded that the difference in ions' distribution in moss gametophyte cells is decisive in determining the toxicity of cadmium to be higher than that of lead and copper causing absence of their desorbtion as well. The possibility has been based to apply the moss *D. aduncus* for elaborating biological methods of diagnostic of water reservoirs' ecological state and their purification from heavy metals.