

УДК 582.32:54.06

О.І. Щербаченко, О.Т. Демків

### НАГРОМАДЖЕННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ЇХ ВПЛИВ НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ МОХІВ

*Щербаченко О.І., Демків О.Т. Накопление тяжелых металлов и их влияние на состояние антиоксидантной системы мхов // Науч. зап. Гос. природоведч. музея. – Львов, 2009. – Вып. 25. – С. 125-130.*

Изучали поглотительную способность мха *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. в зависимости от концентрации тяжелых металлов в субстрате. Значительная аккумуляция  $Cd^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  приводит к изменениям функциональной активности компонентов антиоксидантной системы защиты мхов в условиях стресса, способствующим повышению их металлоустойчивости.

*Schcherbachenko O.I., Demkiv O.T. Accumulation of heavy metals and their influence on the state of antioxidative system of mosses // Proc. of the State Nat. Hist. Museum. – Lviv, 2009. – 25. – P. 125-130.*

The dependence of heavy metals ions accumulation in moss *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. from their concentrations in substrate have been studied. Considerable accumulation of  $Cd^{2+}$  and  $Pb^{2+}$  ions led to the changes of functional activity of the components of antioxidative system, which made the moss more stable to heavy metals stress.

Забруднення природного середовища хімічними сполуками, у тому числі важкими металами (ВМ), істотно впливає на функціонування рослинних організмів.

Захист рослин від токсичної дії ВМ здійснюється регуляцією поглинання та акумуляції як на рівні цілого організму, органів, тканин, так і детоксикацією металу на внутрішньоклітинному рівні [1]. Здатність рослин нагромаджувати ВМ зумовлена морфологічними та екологічними особливостями досліджуваного виду, його віком, сезонною динамікою температури і освітлення середовища [12]. Кількість металу, яку організм може акумулювати, залежить від співвідношення метал/біомаса, тривалості інкубації, складу і концентрації металу в середовищі, може змінюватися залежно від виду рослин і для кожного з них є величиною сталою [15, 17]. Здатність мохоподібних нагромаджувати токсичні речовини у підвищених концентраціях успішно використовують для біоіндикації забруднення природного середовища ВМ [13-15].

Одним із наслідків дії ВМ на живі організми є нагромадження активних форм кисню і зростання інтенсивності процесів пероксидного окислення ліпідів. В оптимальних умовах для росту й розвитку рослин утворюється незначна кількість пероксиду водню, який виконує важливу роль у лігніфікації клітинної стінки, активації захисних систем, експресії генів і процесів, спрямованих на підвищення стійкості до несприятливих факторів [8]. У стресових умовах зростає вміст  $H_2O_2$ , який негативно впливає на білки та ліпіди мембран і призводить до пошкоджень ДНК [11].

Збалансоване функціонування компонентів антиоксидантної системи є основним механізмом усунення надлишку вільних радикалів. Важливу роль у захисті рослин від деструктивного впливу  $H_2O_2$  виконують антиоксидантні ферменти каталаза та

глутатіонпероксидаза [4, 6]. Встановлено захисну роль каталази від надмірного розвитку вільнорадикального окиснення: рослини тютюну, дефіцитні за каталазою, були чутливіші до дії озону, сольового стресу і навіть світла [18]. Під впливом стрес-факторів (гіпертермія, засолення) відбувалась індукція генів супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази [19].

Взаємозв'язок між специфікою нагромадження ВМ та адаптивною реакцією мохоподібних залишається найменш дослідженим. Метою роботи було дослідити особливості нагромадження іонів свинцю і кадмію та їх вплив на стан антиоксидантної системи захисту моху *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. від окислювальної деструкції.

### Матеріал і методика досліджень

Для аналізу поглинальної здатності використовували непошкоджені, без відмерлих частин верхівки пагонів моху *D. aduncus* довжиною  $\approx 2$  см, які інкубували у розчинах з 0,1-100,0 мкМ  $Pb(NO_3)_2$  або  $CdCl_2$  упродовж 24 год, після чого промивали дистильованою водою. Для контролю використовували верхівки пагонів, які витримували у водному розчині без солей ВМ.

Вміст ВМ у рослинах і розчинах визначали атомно-абсорбційним методом [5]. Здатність моху нагромаджувати ВМ оцінювали за показником статичної обмінної ємності (СОЄ):

$$COE = (C_{\text{вих.}} - C_{\text{кін.}}) \times V/m,$$

де  $C_{\text{вих.}}$  і  $C_{\text{кін.}}$  – вихідна і кінцева концентрації іонів ВМ у розчині, мг/мл;  $V$  – об'єм розчину, мл;  $m$  – маса наважки моху, мг/г сухої речовини.

Концентрації солей ВМ підбрано експериментально у результаті аналізу їх впливу на ріст і розвиток моху *D. aduncus*. Контрольні досліди на кислотні залишки солей ВМ не проводили, оскільки доведено, що фітотоксичність металів зумовлюють катіони, а вплив аніонів є не істотним [16, 2].

Активність антиоксидантних ферментів, вміст пероксиду водню та білка визначали за методами [3, 6, 10, 11]. Досліди виконували у 3-кратній повторності. Отримані дані опрацьовували статистично за допомогою програми „Excel”.

### Результати досліджень та їх обговорення

Ступінь акумуляції іонів свинцю та кадмію рослинами *D. aduncus*, який оцінювали за величиною іонообмінного коефіцієнта СОЕ, залежав від їх концентрації у середовищі. Значення СОЕ у пагонах моху підвищувалися пропорційно до вмісту ВМ у розчинах (таблиця).

Виявлено, що 1 г моху *D. aduncus* поглинав з 1,0 мкМ розчину  $Pb(NO_3)_2$  57,9%  $Pb^{2+}$ , з 10,0 мкМ – 82,6%  $Pb^{2+}$ , натомість з 100,0 мкМ – лише 42,8%  $Pb^{2+}$ . Подібні результати отримали і у дослідях з кадмієм: 81,8%, 95,5 % і 68,6%  $Cd^{2+}$  відповідно.

Нагромадження свинцю і кадмію рослинами *D. aduncus* з розчинів різних концентрацій відбувалося поступово, але до певної межі насичення. Іони металів, акумульовані за нижчих від межі насичення концентрацій, зв'язувалися у клітинах

моху і не вимивалися у розчин, порівняно з металами, що поглиналися вище від межі насичення.

Отже, найвищий рівень нагромадження ВМ мохом *D. aduncus* виявлено у варіантах досліду з 1,0-10,0 мкМ концентраціями металів. Вміст кадмію у пагонах моху був вищим, ніж свинцю, що, очевидно, пов'язано з різними фізико-хімічними властивостями металів (електронегативністю, схильністю до комплексоутворення й стійкістю хелатів, спорідненістю до певних хімічних груп і біологічною доступністю) та різними клітинними механізмами їх нагромадження [9].

Таблиця

#### Нагромадження ВМ у пагонах моху *Drepanocladus aduncus*

Концентрації солей металів, мкМ/л	C <sub>вих</sub> розчину, мг/мл	C <sub>кн.</sub> розчину, мг/мл	СОЄ, мг/г сухої речовини
0 (Контроль)	0	0,005	0,005
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>			
1,0	0,207	0,06±0,004	0,14±0,03
10,0	2,070	0,35±0,02	1,71±0,21
100,0	20,70	11,82±0,54	8,87±0,39
<b>CdCl<sub>2</sub></b>			
1,0	0,11	0,02±0,001	0,09±0,005
10,0	1,12	0,05±0,001	1,07±0,02
100,0	11,2	5,71±0,44	5,49±0,61

Вважають, що Cd<sup>2+</sup> і Pb<sup>2+</sup> проникають у клітину переважно в результаті іонообмінних процесів [15]. Активне поглинання іонів кадмію, ймовірно, спричинене вищою рухливістю металу і для його транспорту задіяні Р-помпи плазмалеми, тобто Са<sup>2+</sup>-АТФази і/або інші системи активного транспорту. Крім того, ВМ, особливо Cd<sup>2+</sup>, індукують синтез фітохелатинів, які сприяють металостійкості рослин [7].

ВМ можуть негативно впливати на загальний функціональний стан рослинного організму, спричиняючи значні патологічні зміни. Характер адаптивних реакцій рослин залежить від різновиду, дози, тривалості дії стресора, чутливості організму і його фізіологічного стану. Відзначено взаємозв'язок між рівнем активності компонентів антиоксидантної системи і стійкістю рослин до несприятливих факторів [4].

Встановлено, що вміст H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у пагонах моху *D. aduncus* залежав від концентрації ВМ у середовищі. У пагонах моху, які інкубували у розчинах із 0,1 і 1,0 мкМ Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, вміст пероксиду водню не істотно відрізнявся від контролю, тоді як за дії 10,0 і 100,0 мкМ Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> його вміст перевищував контрольні показники в 1,3 і 1,5 рази (рис. 1). Отже, високі концентрації нітрату свинцю спричиняють значне нагромадження пероксиду водню у клітинах моху.

У варіантах із CdCl<sub>2</sub> концентрація пероксиду зростала із підвищенням вмісту ВМ у середовищі. Під впливом 0,1 і 1,0 мкМ CdCl<sub>2</sub> вміст пероксиду водню зростав у 1,1 і 1,2 рази, порівняно з контролем. У варіантах із 10,0 і 100,0 мкМ CdCl<sub>2</sub> рівень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> перевищував контрольні показники в 1,7 та 1,6 рази.

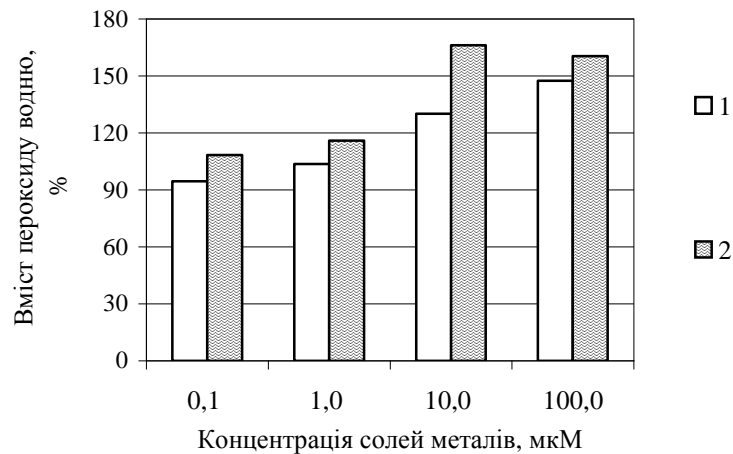


Рис. 1. Вплив Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1) та CdCl<sub>2</sub> (2) на вміст пероксиду водню у клітинах моху *Drepanocladus aduncus* (контроль прийнято за 100 %).

Значна кількість пероксиду водню утворюється в умовах стресу і є сигналом для запуску різних біохімічних і фізіологічних захисних реакцій у клітинах. Каталаза розщеплює H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до кисню та води і не потребує відновного субстрату для свого функціонування. Активність каталази у пагонах *D. aduncus* не істотно змінювалася під впливом нижчих концентрацій нітрату свинцю (0,1-1,0 мкМ) і хлориду кадмію (0,1 мкМ), порівняно з контролем (рис. 2), що могло бути спричинене інгібуючою дією вільних радикалів на метали активного центру ферменту.

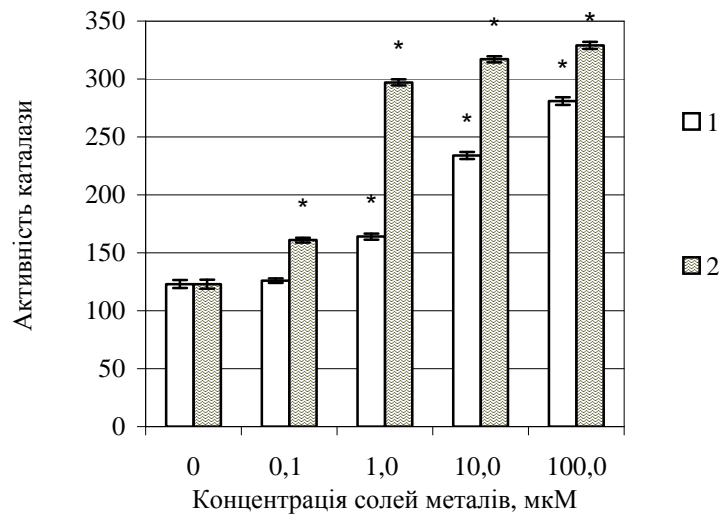


Рис. 2. Вплив ВМ на активність каталази (мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мг білка за хв) у клітинах моху *Drepanocladus aduncus*: 1 – Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2 – CdCl<sub>2</sub>.

Примітка: \* – різниця порівняно до контролю статистично достовірна,  $p \leq 0,05$ .

Рівень активності каталази істотно зростає під впливом 10,0-100,0 мкМ  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  і 1,0-100,0 мкМ  $\text{CdCl}_2$ . Отже, у захисті клітин *D. aduncus* від окислювальної деструкції, зумовленої надлишком  $\text{H}_2\text{O}_2$ , каталаза виконує важливу роль.

Показники активності глутатіонпероксидази (ГП) у пагонах моху *D. aduncus* зростають з підвищенням вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 3). Активність ГП у клітинах моху була вищою, ніж каталази, що, очевидно, зумовлено достатньою кількістю субстрату та ефективнішою діяльністю ферменту з детоксикації  $\text{H}_2\text{O}_2$  за дії ВМ.

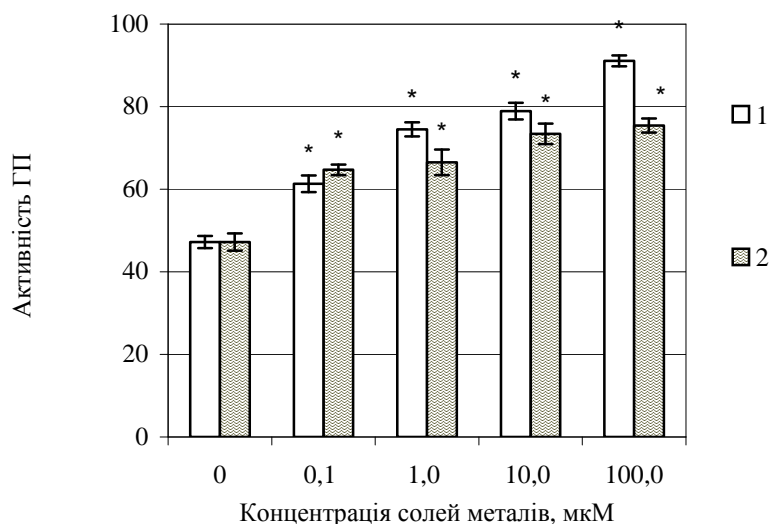


Рис. 3. Зміни активності глутатіонпероксидази (мкМ НАД·Н<sub>2</sub>/мг білка за хв) у клітинах моху *Drepanocladus aduncus* за дії ВМ: 1 –  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 2 –  $\text{CdCl}_2$ .

Примітка: \* – різниця порівняно до контролю статистично достовірна,  $p \leq 0,05$ .

### Висновки

На підставі проведених досліджень встановлено, що *D. aduncus* властивий високий рівень акумуляції ВМ. Іони свинцю та кадмію впливали на розвиток оксидного стресу в клітинах моху, індукуючи зростання вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Імовірно, що власне  $\text{H}_2\text{O}_2$  є одним із чинників, що стимулює активність антиоксидантної системи *D. aduncus*. Підвищення активності антиоксидантних ферментів – каталази та ГП під впливом ВМ можна розглядати як захисний механізм, який запобігає стресовому вільнорадикальному окисленню та сприяє підвищенню металостійкості моху.

### Подяка

Автори висловлюють щире подяку науковому співробітнику Інституту екології Карпат НАН України, к.б.н. В.І. Козловському за визначення вмісту важких металів у рослинному матеріалі та розчинах.

1. Гуральчук Ж.З. Акумуляція кадмію та вміст елементів мінерального живлення в рослинах // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть. Т. 1. – К., 2001. – С. 183-186.
2. Довгалюк А.І. Порівняння цитогенетичної та антимікротрубочкової активності фітотоксичних металів // Автореферат дис. канд. біол. наук. – К., 2004. – 24 с.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1986. – **1**. – С. 16-20.
4. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях // Под ред. Е.Л. Кордюм. – К.: Наук. думка, 2003. – 277 с.
5. Методические рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды металлами. – М., Гидрометеоздат, 1981. – 168 с.
6. Моин В.М. Простой и специфический метод для определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. – 1985. – **12**. – С. 724-726.
7. Серегин И.В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Успехи биологической химии. – 2001. – 41. – С. 283-300.
8. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
9. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. – Минск: Наука и техника, 1991. – 272 с.
10. Bredford W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248-252.
11. Di Toppi L.S., Lambardi M., Pazzagli L. et al. Response to cadmium in carrot *in vitro* plants and cell suspension cultures // Plant Science. – 1999. – **137**. – P. 119-129.
12. 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, Universite de Metz. – 1987. – P. 1-122.
13. Onianwa P.C. Monitoring atmospheric metal pollution: a review of the use of mosses as indicators // Environ. Monit. Asses. – 2001. – **71**, № 1. – P. 13-50.
14. 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. – **113**, № 1. – P. 41-57.
15. 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.
16. Sunil D. Sharma and R.N. Chopra. Effect of Lead Acetate and Lead Nitrate on Growth of the Moss *Semibarbula orientalis* (Web.) Wijk. et Marg. Grown *in vitro* // J. Plant. Physiol. – 1987. – **129**. – P. 243-249.
17. Tyler G. Bryophytes and heavy metals: a literature review // Bot. J. Linn. Soc. – 1990. – **104**. – P. 231-253.
18. Willekens H., Moeder W., Langebartels Ch., Sandermann H., Van Montagu M., Inze D. and Van Camp W. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – **95**. – P. 5818-5823.
19. Zeng H., Lin P. Xiamen daxue xuebao. Ziran Kexue ban // J. Xiamen Univ. Natr. Sci. – 1998. – **37**, № 2. – P. 278.

Інститут екології Карпат НАН України, м. Львів  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua