

## Особливості накопичення і розподілу важких металів у клітинах моху *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst.

ОКСАНА ІГОРІВНА ЩЕРБАЧЕНКО

ЩЕРБАЧЕНКО О.І., 2012: **Особливості накопичення і розподілу іонів важких металів у клітинах моху *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst.** *Чорноморськ. бот. ж.* т. 8, № 2: 189-194.

Встановлено високий рівень нагромадження мохом *Drepanocladus aduncus* іонів важких металів ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  і  $\text{Cu}^{2+}$ ) із розчинів 1,0-10,0 мкМ. Аналізуючи розподіл поглинутих іонів у клітинах, з'ясовано, що ~87%  $\text{Pb}^{2+}$ , ~68%  $\text{Cu}^{2+}$  і ~96%  $\text{Cd}^{2+}$  локалізовано внутрішньоклітинно. Компонентами клітинних стінок затримувалось ~13% іонів свинцю, ~32% іонів міді і ~4% іонів кадмію. Не виключено, 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 і очищення забруднених екоотопів.

*Ключові слова:* важкі метали, нагромадження, внутрішньоклітинний розподіл, мох *Drepanocladus aduncus*

SHCHERBACHENKO O.I., 2012: **Accumulation and distribution of ions of heavy metals in cells of moss *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst.** *Chornomors'k. bot. z.*, vol. 8, N 2: 189-194.

Accumulation of high level of heavy metals ions ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ ) from 1,0-10,0  $\mu\text{M}$  solutions is revealed for the moss *D. aduncus*. The analysis of absorbed ions is shown that ~87%  $\text{Pb}^{2+}$ , ~68%  $\text{Cu}^{2+}$  and ~96%  $\text{Cd}^{2+}$  are localized inside a cell, ~13% of lead ions, ~32% of copper ions and ~4% cadmium ions being kept by components of cell' wall. It is possible 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 desorption as well. Usage of *D. aduncus* for elaborating biological methods of diagnostic and purification of polluted ecotopes is justified.

*Key words:* heavy metals, accumulation, distribution in cells, *Drepanocladus aduncus*

ЩЕРБАЧЕНКО О.И., 2012: **Особенности накопления и распределения ионов тяжелых металлов в клетках мха *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst.** *Черноморск. бот. ж.* т. 8, № 2: 189-194.

Установлен высокий уровень накопления мхом *Drepanocladus aduncus* ионов тяжелых металлов ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ ) из растворов 1,0-10,0 мкМ. Анализируя распределение аккумуляированных ионов в клетках, установлено, что ~87%  $\text{Pb}^{2+}$ , ~68%  $\text{Cu}^{2+}$  и ~96%  $\text{Cd}^{2+}$  связывались внутриклеточно. Компоненты стенок клеток задерживали ~13% ионов свинца, ~32% ионов меди и ~4% ионов кадмия. Не исключено, что отличия в распределении ионов в клетках мха являются определяющими для большей токсичности кадмия, чем свинца и меди, а также объясняют отсутствие их десорбции. Обоснована возможность применения мха *D. aduncus* для разработки бриологических методов диагностики и очистки загрязненных экотопов.

*Ключевые слова:* тяжелые металлы, накопление, внутриклеточное распределение, мох *Drepanocladus aduncus*

Зростання обсягів промислового виробництва, транспортного навантаження спричинює забруднення природного середовища важкими металами (ВМ). Оскільки 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 та акумуляції як на рівні цілого організму, органів, тканин, так і детоксикацією металу на внутрішньоклітинному рівні [Гуральчук, 2005]. Здатність мохоподібних нагромаджувати ВМ зумовлена морфологічними та екологічними особливостями досліджуваного виду, віком культури, сезонною динамікою температури і освітлення середовища. Кількість металу, яку організм може акумулювати, залежить від співвідношення метал/біомаса, тривалості інкубації, складу і концентрації іонів у середовищі [MOUVEY, 1987; Гуральчук, 2006].

У ролі біологічних індикаторів, які чутливо реагують на зміни забруднення середовища (насамперед, ВМ) та дозволяють виявляти рівень його забруднення, використовують різні групи організмів (бактерії, базидіоміцети, водорості, лишайники, молюски і ін.) [Вінниченко, Долгова, 2001]. Мохи проаналізовані значно слабше, хоча саме в них вплив важких металів проявляється набагато контрастніше. Бріюфіти як безсудинні рослини, на відміну від інших представників вищих рослин, поглинають мінеральні речовини всією поверхнею тіла, завдяки чому нагромаджують полютанти, у тому числі радіоактивні елементи й ВМ, у підвищених концентраціях і не виробили ніяких механізмів дискримінації щодо надмірного поглинання токсичних речовин [Речевська, 1999; Маєвська, 2001; ONIANWA, 2001; REIMANN et al. 2001]. Однак природа сорбційних властивостей мохів залишається недостатньо вивченою, 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 метою нашої роботи було вивчення особливостей нагромадження та зовнішньо- і внутрішньоклітинного розподілу іонів ВМ у гаметофіті моху *D. aduncus* залежно від їх концентрацій у розчинах, оцінити можливість використання моху для діагностики рівнів забруднення й очистки забруднених екотопів.

### Матеріали та методи досліджень

Об'єктом досліджень був гігрогідрофітний мох *D. aduncus*, який виростили у лабораторії шляхом регенерації гаметофіту із зразків, зібраних в околицях м. Львова. Для аналізу поглинальної здатності використовували непошкоджені, без відмерлих частин листкостеблові пагони моху *D. aduncus* довжиною 2–2,5 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. Здатність моху нагромаджувати ВМ оцінювали за показником статичної обмінної ємності (СОЕ):

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

де  $C_{вих.}$  і  $C_{кін.}$  – вихідна і кінцева концентрації іонів ВМ у 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 у розчинах 10,0 мкМ  $Pb(NO_3)_2$ ,  $CdCl_2$  або  $Cu(SO_4)_2$  упродовж 2 год. при кімнатній температурі, після цього 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 мМ розчин ЕДТА і у 20 мМ 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 у 1 М HNO<sub>3</sub> і двічі промивали по 30 хв., постійно струшуючи зразки. Рослини повторно висушували, як описано вище, для визначення їх сухої маси. За різницею цих мас оцінювали масу цитозолу і масу клітинної стінки [BROWN, WELLS, 1988]. Розчини не фільтрували, щоб запобігти втраті елементів. Вміст ВМ у рослинах і розчинах визначали атомно-адсорбційним методом [МЕТОДИЧЕСКИЕ..., 1981]. Контролем були рослини, які експонували у водному розчині без ВМ. Усі аналізи проводили у 3-кратній повторності, отримані дані опрацьовували методами статистичного аналізу [ЛАКИН, 1990].

### Результати досліджень та їх обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що ступінь акумуляції іонів свинцю, кадмію та міді рослинами *D. aduncus*, який оцінювали за величиною іонообмінного коефіцієнта СОЕ, залежав від їх концентрації у середовищі. Значення СОЕ у пагонах моху підвищувалися із підвищенням вмісту ВМ у розчинах (табл. 1).

Таблиця 1

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

Table 1

#### Accumulation of heavy metals ions in the moss shoots *Drepanocladus aduncus*

Концентрації солей металів, мкМ	*С <sub>вих</sub> розчину, мг/мл	*С <sub>кін.</sub> розчину, мг/мл	*СОЕ, мг/г сух. р.
0 (Контроль)	0	0	0
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			
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
CdCl <sub>2</sub>			
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
CuCl <sub>2</sub>			
1,0	0,063	0,023+0,003	0,04+0,001
10,0	0,63	0,32+0,01	0,31+0,04
100,0	6,3	3,49+0,3	2,81+0,12

\*С<sub>вих</sub> – концентрація вихідного розчину; С<sub>кін.</sub> – концентрація кінцевого розчину; СОЕ – показник статичної обмінної ємності.

Виявлено, що 1 г моху *D. aduncus* поглинав з 1,0 мкМ розчину Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 57,9 % Pb<sup>2+</sup>, з 10,0 мкМ – 82,6 % Pb<sup>2+</sup>, натомість з 100,0 мкМ – лише 42,8 % Pb<sup>2+</sup>. Подібні результати отримали і у дослідях з кадмієм: 81,8 %, 95,5 % і 68,6 % Cd<sup>2+</sup> відповідно. Слабше пагони моху нагромаджували з розчинів мідь: 63,5 % Cu<sup>2+</sup> з 1 мкМ, 49,2 % Cu<sup>2+</sup> з 10,0 мкМ і 42,8 % Cu<sup>2+</sup> з 100,0 мкМ. Імовірно, це зумовлено тим, що мідь належить до складу необхідних для росту й розвитку рослин мікроелементів, і поруч із сорбцією відбувається утилізація рослинами її катіонів. Нагромадження ВМ рослинами *D. aduncus* з розчинів різних концентрацій відбувалося поступово, але до певної межі насичення. Іони металів, акумульовані при нижчих від межі насичення концентраціях, зв'язувалися у клітинах моху і не вимивалися у розчин, порівняно з металами, що поглиналися із вищих від межі насичення концентрацій розчинів металів.

Отже, найвищий рівень нагромадження ВМ мохом *D. aduncus* виявлено у варіантах дослідів з 1,0–10,0 мкМ концентраціями металів. За вмістом у пагонах моху метали розподілялися в такій послідовності: Cd<sup>2+</sup>>Pb<sup>2+</sup>>Cu<sup>2+</sup>, 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 [ASSCHE, CLIJSTERS, 1990]. Відомо, що транспорт міді контролюється як неспецифічними механізмами (іонні канали, редуказні системи), характерними для всіх інших мікроелементів, так і специфічними. До них належать перенесення міді в комплексі з нікотинаміном і наявність  $\text{Cu}^{2+}$ -АТФаз, які забезпечують транспорт міді через плазмалему [ЮРИН и др., 1991]. Вважають, що  $\text{Cd}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$  проникають у клітину переважно в результаті іонообмінних процесів [SALT et al., 1995; Гуральчук, 2006]. Активне поглинання іонів кадмію, ймовірно, спричинене вищою рухливістю металу і для його транспорту задіяні Р-помпи плазмалеми, тобто  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази і/або інші системи активного транспорту. Крім того, ВМ, особливо  $\text{Cd}^{2+}$ , індують синтез фітохелатинів, які сприяють металостійкості рослин [ФЕНИК и др., 1995; Серегин, 2001].

Мохи, як безсудинні рослини, поглинають воду і мінеральні речовини не лише з ґрунту, але 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 знаходитися: а) як звичайне поверхнєве забруднення пагонів; б) фізико-хімічно зв'язаними компонентами клітинних стінок; в) хелатованими всередині клітин [BROWN, 1984]. Перший етап поглинання мінеральних елементів, у тому числі ВМ, рослинами зумовлений фізико-хімічними процесами у апопласті, тобто дифузією і зв'язуванням іонів з компонентами клітинних стінок. Подальший перехід іонів у симпласт носить більш вибірковий характер.

Е. Небоер та Д. Річардсон [NIEBOER, RICHARDSON, 1980] запропонували класифікацію катіонів за спорідненістю до аніонних лігандів клітинної стінки: до О-вмісних лігандів ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), до N- та S-вмісних лігандів ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  та  $\text{Hg}^{2+}$ ) і до обох типів аніонних лігандів. У клітинних стінках мохів переважають О-вмісні карбоксильні групи пектинів. Хоча у деяких мохів наявні аніонні ділянки з N- і S-місткими лігандами, можливо протейнової природи, які знаходяться всередині матриксу клітинної стінки або на поверхні плазматичної мембрани [BROWN, WELLS, 1990 a]. 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. Таким чином, зовнішньоклітинне зв'язування є одним з механізмів, які частково запобігають проникненню іонів ВМ у цитозоль, що впливає на загальний функціональний стан рослинного організму.

Застосувавши метод послідовної елюції (вимивання) катіонів Д. Брауна та Дж. Уелса [BROWN, WELLS, 1988], ми проаналізували розподіл іонів  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Cd}^{2+}$  у клітинах моху *D. aduncus* і встановили співвідношення між кількістю ендо- та екзогенних катіонів. Виявлено, що у клітинних стінках *D. aduncus* затримувалося ~13%  $\text{Pb}^{2+}$ , ~32%  $\text{Cu}^{2+}$  і ~4%  $\text{Cd}^{2+}$  від загальної кількості поглинутих катіонів. Це свідчить, що іони  $\text{Cu}^{2+}$  найміцніше зв'язуються з компонентами клітинних стінок, а отже, і повільніше пересуваються по апопласту порівняно з  $\text{Pb}^{2+}$  та  $\text{Cd}^{2+}$ . У цитозолі клітин вміст ВМ становив ~87%  $\text{Pb}^{2+}$ , ~68%  $\text{Cu}^{2+}$  і ~96%  $\text{Cd}^{2+}$  (рис. 1).

Тривалість часу проникнення катіону характеризує кінетику насичення металу, і ця тривалість варіює для різних організмів. Д. Браун та Дж. Уелс [BROWN, WELLS, 1988; BROWN, WELLS, 1990 a] експериментально встановили, що 30 хвилин достатньо для цілковитого поглинання кадмію з розчину 0,1 мкМ концентрації металу, хоча насичення у природі триває значно довше – протягом декількох днів і за нижчих концентрацій. Подібні результати одержані і у дослідах з іншими рослинами [Гуральчук, 1994; CATALDO et al., 1991]. Автори встановили, що процес поглинання кадмію має двохфазний характер. Перша стадія – швидка, початкова, яка відображає

процес зв'язування  $\text{Cd}^{2+}$  з компонентами апопласта (триває ~30 хв.), протягом якої поглинається майже 80 % металу із субстрату. Наступна стадія насичення – повільна, яка реалізується в результаті транспорту  $\text{Cd}^{2+}$  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.

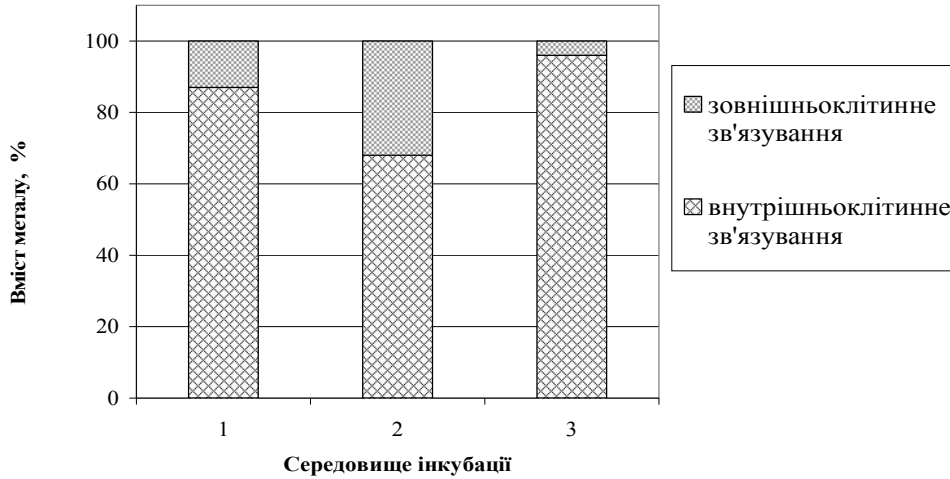


Рис. 1. Внутрішньоклітинний розподіл іонів важких металів у пагонах моху *D. aduncus*: 1 – свинцю, 2 – міді, 3 – кадмію.

Fig. 1. Distribution of heavy metals ions inside cells of moss shoots *D. aduncus*: 1 – lead, 2 – copper, 3 – cadmium.

### Висновки

На підставі проведених досліджень встановлено, що *D. aduncus* властивий високий рівень акумуляції ВМ, які іммобілізуються переважно внутрішньоклітинно. Частина іонів зв'язується з компонентами стінок клітин моху, 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 *D. aduncus*, на нашу думку, необхідно враховувати у фізіолого-біохімічних дослідженнях та під час розробки біологічних методів діагностики і очищення забруднених екотопів.

\*\*\*\*\* Автор роботи висловлює щире подяку науковому співробітнику Інституту екології Карпат НАН України, к.б.н. В.І. Козловському за допомогу при визначенні вмісту важких металів у рослинах моху та розчинах.

### Список літератури

- 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.
- Гуральчук Ж.З. Надходження та детоксикація важких металів у рослинах // Живлення рослин: теорія і практика. – К.: Логос, 2005. – С. 438-475.
- Гуральчук Ж.З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії / Ін-т фізіології рослин і генетики НАН України. – К.: Логос, 2006. – 208 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- МАСЬВЬКА С.М. Морфо-фізіологічні аспекти стійкості мохів до токсичної дії іонів важких металів // Автореф. дис... канд. біол. наук. – Львів, 2001. – 21 с.
- МЕТОДИЧЕСКИЕ рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. – М.: Гидрометеоздат, 1981. – 80 с.

- РЕЧЕВСЬКА Н.Я. Адаптація мохів до токсичної дії важких металів // Автореф. дис... канд. біол. наук. – Львів, 1999. 1- 7 с.
- СЕРЕГИН И. В., ИВАНОВ В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 4. – С. 606-630.
- ФЕНИК С.И., ТРОФИМЯК Т.Б., БЛОМ Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Усп. совр. биол. – 1995. – Т. 115, Вып. 3. – С. 261-275.
- ЮРИН В.М., СОКОЛИК А.И., КУДРЯШОВ А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. - Минск: Наука и техника, 1991. - 272 с.
- ASSCHE F., CLUSTERS H. Effect of metals on enzyme activity in plants // Plant, Cell and Environment. – 1990. – Vol. 113. – P. 195-206.
- 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.
- 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.
- 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.
- CATALDO D.A., GARLAND T.R., WILDUNG R.E. Cadmium distribution and chemical fate in soybean plants // Plant Physiol. 1991. – Vol. 68, N4. - P. 835-839.
- 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.
- 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.
- ONIANWA P.C. Monitoring atmospheric metal pollution: a review of the use of mosses as indicators // Environ. Monit. Asses. - 2001. – Vol. 71, N 1. – P. 13-50.
- 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, N 1. – P. 41-57.
- 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. – Vol. 13. – P. 468-474.

Рекомендує до друку  
А.П. Орлюк

Отримано 04.01.2012 р.

Адреса автора:

О. І. Щербаченко  
Інститут екології Карпат  
НАН України  
вул. Стефаника, 11  
Львів, 79000, Україна  
e-mail: [morphogenesis@mail.lviv.ua](mailto:morphogenesis@mail.lviv.ua)

Author's address:

O. I. Shcherbachenko  
Institute of Ecology of the Carpathians  
National Academy of Sciences of Ukraine  
11, Stefanyka str.  
Lviv 79000, Ukraine  
e-mail: [morphogenesis@mail.lviv.ua](mailto:morphogenesis@mail.lviv.ua)