УДК 582.32:54.06

Н.Я. КИЯК
Інститут екології Карпат НАН України
вул. Стефаника, 11, м. Львів, 79000

ОСОБЛИВОСТІ МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ ВОДНОГО МОХУ *FONTINALIS ANTYPYRETICA* HEDW. НА ТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ СВИНЦЮ

ключові слова: *іони свинцю, регенераційна здатність, цитохімічна реакція, перекисне окислення ліпідів, ферменти антиоксидантного захисту*
key words: *lead ions, regenerative ability, cytochemical reaction, peroxide oxidation of lipids, enzymes of antioxidative system*

N.YA. KYJAK

PECULIARITIES OF MORPHO-FUNCTIONAL REACTION OF WATER MOSS *FONTINALIS ANTYPYRETICA* HEDW. ON THE TOXIC INFLUENCE OF LEAD

Institute of ecology of the Carpathians NAS of Ukraine
11 Stefanyk Str., Lviv, 79000, Ukraine

The influence of lead on the growth, physiological and biochemical parameters in the shoots of water moss *Fontinalis antypyretica* Hedw was investigated. It was shown, that *F. antypyretica* sensitively reacts on the influence of heavy metal. It was established, that the first visual symptom of the lead toxicity is the decrease of shoots regenerative ability. The specificity of the lead ions accumulation in *F. antypyretica* leaves cells was established. The metal ions were revealed in the cells, however their large part will be located on the surface of leaves. The increase of level of peroxide oxidation of lipids in the *F. antypyretica* cells was fixed. The influence of lead on activity of enzymes of antioxidative system was investigated. The increase of activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase and glutathione peroxidase was established.

Проблеми підвищення стійкості рослин в умовах зростання антропогенного навантаження на екосистеми зумовлюють особливу актуальність вивчення механізмів адаптації рослин до несприятливих впливів навколишнього середовища.

Через широке розповсюдження та токсичність важкі метали сьогодні є одним із найнебезпечніших компонентів як наземних, так і водних екосистем. Підвищений вміст солей важких металів у водних екосистемах може бути зумовлений як геохімічними особливостями регіону, так і господарською діяльністю людини – у результаті внесення в ґрунт хімікатів (у тому числі й мінеральних добрив) та забруднення водойм промисловими стічними водами. Вплив важких металів на морфо-функціональні параметри організму та особливості функціонування захисних систем досліджувався, переважно, на прикладі наземних рослин [5; 7; 13]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження впливу іонів свинцю на ростові та фізіолого-біохімічні показни-

ки водного моху *Fontinalis antipyretica* Hedw.

Об'єкти та методи досліджень

У дослідах використовували пагони водного моху *F. antypyretica*, які протягом 1 місяця вирощували на водному поживному середовищі Кноп-ІІ із вмістом ацетату свинцю у концентрації 1,0-100,0 мкмоль/л.

Для кількісного порівняння толерантності досліджуваних зразків використовували метод Уілкінса [16], який базується на визначенні індексу толерантності (ІТ) рослин:

$$IT = \frac{\text{приріст на середовищі з досліджуваним металом}}{\text{приріст на контрольному середовищі}} \times 100\%$$

Для оцінки приросту використовували регенерацію ізольованих пагонів моху.

Цитохімічне визначення іонів свинцю в листках *F. antipyretica* проводили за методом І.Серьогіна та В.Іванова [14], який базується на фарбуванні рослинного матеріалу дитізоном. Активність компонентів захисної антиоксидантної системи визначали за стандартними методиками. Активність супероксиддисмутази визначали за методом С.Чеварі [4]; активність каталази – за методом М.Королюк [1], активність глутатіонпероксидази оцінювали за методом В.Моїна [2]; активність глутатіонредуктази – за методом J.Smith et al. [15]. Вміст малонового диальдегіду в рослинному матеріалі визначали за методом М.Мусієнко [3]. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [10]. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми „Excel".

Результати досліджень та їх обговорення

У дослідах використовували пагони *F. antipyretica*, які протягом 1 місяця вирощували на водному поживному середовищі Кноп-ІІ із вмістом ацетату свинцю у концентрації 1,0-100,0 мкмоль/л. Пригнічення ростових процесів рослин – це початковий візуальний симптом токсичності полютанта. Для оцінки впливу свинцю на ріст водного моху аналізували регенераційну здатність та приріст бічних пагонів, на підставі чого визначали індекс толерантності (ІТ) організму.

Як видно з табл. 1., токсичність металу зростала пропорційно до його вмісту в середовищі. Найістотніші зміни виявлено у рослин, які росли на середовищі з концентрацією металу 100,0 мкмоль/л. У цьому випадку регенераційна здатність сповільнювалася майже втричі, суттєво пригнічувався ріст бічних пагонів, свідченням чого є досить низький індекс толерантності (ІТ=42%). Рослини, які росли на середовищі з концентрацією свинцю 1,0 мкмоль/л за своїми ростовими показниками були наближені до контрольного варіанту (ІТ=94%).

Токсичність важкого металу завжди тісно пов'язана зі специфікою його проникнення та локалізації в рослинному організмі. Застосування цитохімічного експрес-методу виявлення важкого металу, що базується на фарбуванні

рослинного матеріалу дитізоном, дозволило виявити особливості накопичення іонів свинцю у клітинах листкових пластинок водного моху *F. antipyretica.* У результаті 1-годинної інкубації рослинного матеріалу у середовищі з металом виявилося, що усі клітини листка були забарвлені у червоний колір (порівняно з контролем) без явної диференціації всередині клітини, що свідчить про входження іонів свинцю у клітини листкової пластинки й утворення з дитізоном нерозчинних солей-дитізонатів (рис.1, 2). Дещо інтенсивніше були забарвлені клітини крайової зони листка (перші 2-3 ряди клітин).

Таблиця 1.

Вплив ацетату свинцю на регенераційну здатність водного моху *F. antipyretica*

Концентрація ацетату свинцю, мкмоль/л	К-сть проаналізованих пагонів	К-сть утворених бічних пагонів	Довжина бічного пагона, см	ІТ, %
Контроль	20	2,9±0,02	1,9±0,05	
1,0	20	2,2±0,08	1,7±0,09	94
10,0	20	1,6±0,03	1,2±0,02	63
100,0	20	1,2±0,01	0,8±0,01	42

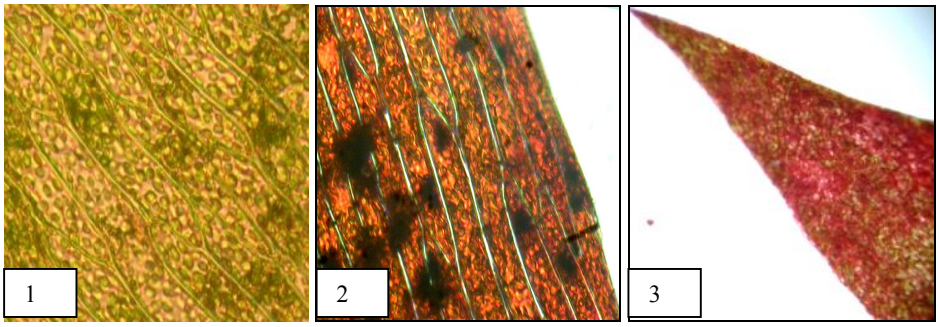

Рис. 1. Фрагмент листкової пластинки *F. antipyretica* контрольного варіанту, зафарбованого дитізоном.
Рис. 2. Накопичення свинцю в клітинах листкової пластинки *F. antipyretica*, інкубованої на середовищі з 100,0 мкмоль/л свинцю.
Рис. 3. Локалізація дитізонатів на поверхні листкової пластинки *F. antipyretica*, інкубованої на середовищі з 100,0 мкмоль/л свинцю.

Інтенсивність якісної реакції значною мірою залежала від концентрації свинцю в середовищі. Найінтенсивніша реакція спостерігалася на середовищі з концентрацією свинцю 100,0 мкмоль/л. На середовищі з металом у концентрації 1,0 мкмоль/л якісна реакція була значно слабшою. Специфікою даного виду є те, що поряд із внутрішньоклітинною локалізацією, значна частина іонів свинцю зв'язується на поверхні листкової пластинки. Свідченням цього є наявність великої кількості кристалів дитізонатів, які вкривають поверхню листкової пластинки, особливо верхівку та базальну частину листка, де вони

утворюють суцільний покрив (рис. 3). Вони міцно зв'язані з поверхнею листка, що пояснюється, очевидно, тим, що дитізон щодо свинцю виявляє високу спорідненість і рівень дифузії солей дитізонатів у реакційне середовище є надзвичайно низьким [14]. Можна припустити, що частина іонів металу зв'язується клітинними стінками водного моху і таким чином рослина захищається від надмірного входження важкого металу всередину клітини. Відомо, що на поверхні клітинної стінки важкі метали зв'язуються з карбоксильними групами полігалактуронових кислот, спорідненість до яких є достатньо високою [11].

Іони важких металів, які проникли всередину клітини порушують донорно-акцепторні співвідношення, підвищують активність утворення вільних кисневих радикалів та перекисних сполук. У результаті відбувається інтенсифікація процесу перекисного окислення ліпідів, що супроводжується змінами жирнокислотного складу ліпідів мембран, в'язкості мембран та їх проникності, а також зміною активності мембраннозв'язаних ферментів.

Сьогодні значна увага приділяється дослідженню процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) мембран рослинних організмів за умов різного стресового впливу. Доведено, що цей процес є одним із універсальних індикаторів реакції клітин на дію цілої низки абіотичних та біотичних факторів. Одним із кінцевих продуктів ПОЛ є малоновий диальдегід (МДА). Встановлено, що концентрація цієї сполуки у клітинах суттєво зростає у відповідь на різні стресові впливи [6; 12], тому вміст МДА слугує показником активності вільнорадикальних окислювальних процесів у клітинах.

Аналіз вмісту МДА у пагонах *F. antipyretica* показав, що в умовах свинцевого стресу відбувається пропорційне зростання вмісту цієї сполуки відповідно до підвищення концентрації металу у субстраті (рис. 4). Під впливом найнижчої концентрації свинцю 1,0 мкмоль/л рівень окислювальних процесів у клітинах водного моху залишається досить стабільним, свідченням чого є вміст МДА, який суттєво не відрізняється від контролю. На вищих концентраціях свинцю 10,0-100,0 мкмоль/л його вміст зростає майже в 1,3 рази.

Важливим регулятором перекисного окислення ліпідів у клітині є багатокомпонентна антиоксидантна система, що представлена ферментами та низькомолекулярними сполуками (глутатіон та аскорбінова кислота). Супероксиддисмутаза (СОД) каталізує реакцію дисмутації супероксидного радикалу O_2^- до молекулярного кисню та пероксиду водню. Це ключовий фермент захисної системи, оскільки він забезпечує первинний внутрішньоклітинний захист в умовах окислювального стресу [9].

У наших дослідах із водним мохом *F. antipyretica* виявлено істотне зростання активності цього фермента (майже у 5 разів, порівняно з контролем) під впливом свинцю у концентрації 10,0-100,0 мкмоль/л (табл. 2). Аналогічні результати були отримані у дослідах із квітковими рослинами [8; 11]. Автори встановили зростання активності СОД під впливом Pb, Cd та Zn у зв'язку зі зростанням концентрації супероксидного аніона в клітині. Крім того, виявлено пригнічення активності СОД в умовах дії іонів Cr та Ni, що, оче-

видно, пов'язано зі заміщенням важким металом іона металу в активному центрі фермента.

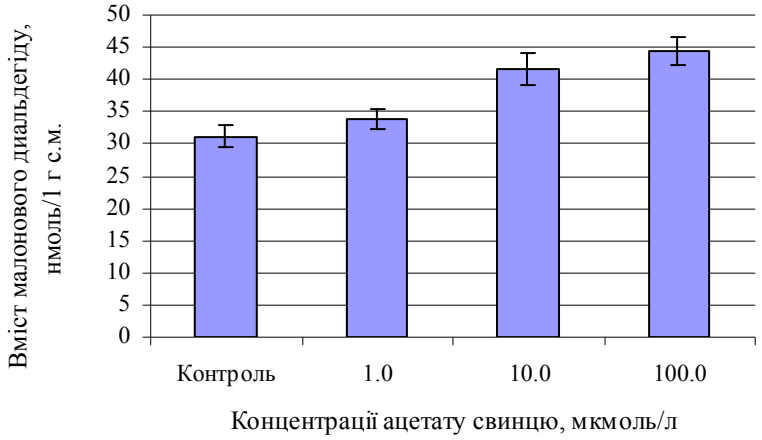

Рис. 4. Вплив свинцю на вміст малонового диальдегіду у пагонах водного моху *F. antipyretica.*

Пероксид водню, який у підвищених концентраціях утворюється в умовах стресу, знешкоджується ферментом каталазою. У пагонах *F. antipyretica* рівень каталазної активності суттєво зростає під впливом свинцю у концентрації 10,0-100,0 мкмоль/л (табл. 2). На середовищі з концентрацією свинцю 1,0 мкмоль/л каталазна активність наближається до контрольного варіанту.

Таблиця 2.

Вплив ацетату свинцю на активність ферментів захисної антиоксидантної системи у пагонах водного моху *F. antipyretica*

№ п/п	Концентр. ацетату свинцю, мкмоль/л	Активність СОД, ум.од./ мг білка/хв	Активність каталази, мкМ H_2O_2 /мг білка/хв	Активність глутатіон-пероксидази, мкМ/г білка/хв	Активність глутатіон-редуктази, мкМ/г білка/хв
1	Контроль	62,5±0,5	0,88±0,05	108,6±8,5	97,2±6,5
2	1,0	81,4±0,7	0,93±0,04	76,8±5,9	79,5±4,2
3	10,0	317,2±12,5	1,29±0,08	246,1±18,2	118,9±10,2
4	100,0	296,3±13,2	1,40±0,06	220,5±15,5	145,6±12,8

У редукції цитотоксичних гідропероксидів важливу роль відіграє і глутатіон-залежна антиоксидантна система. Ключову позицію тут займає фермент глутатіонпероксидаза. Цей фермент, у першу чергу, задіяний у детоксикації фосфоліпідних гідропероксидів, які утворюються в умовах перекисного окислення ліпідів плазматичних мембран [12]. У наших дослідах свинець індукує суттєве підвищення активності цього фермента (табл. 2). Зростання активності глутатіонпероксидази майже у 2,5 рази встановлено під впливом

10,0-100,0 мкмоль/л концентрації свинцю.

Постійне підтримання пулу відновленого глутатіону в клітині забезпечується глутатіонредуктазною активністю. У пагонах моху *F. antipyretica* активність цього фермента зростала прямопропорційно до підвищення концентрації металу у середовищі (табл. 2). Виявлено зростання активності глутатіонредуктази майже у 1,5 рази під впливом 100,0 мкмоль/л свинцю. Очевидно, в клітинах водного моху в умовах стресу, спричиненого дією металу, процеси окислення глутатіону відбуваються досить інтенсивно, що пояснює істотне зростання активності глутатіонредуктази, яка спрямована на поповнення пулу відновленого глутатіону в клітині.

Висновки

На підставі проведених досліджень установлено, що водний мох *F. antipyretica* здатний чутливо реагувати на вплив свинцю. Найтоксичнішими виявилися концентрації металу 10,0 та 100,0 мкмоль/л. Найпершим візуальним проявом токсичності свинцю є зниження регенераційної здатності пагонів.

Досліджено специфіку накопичення свинцю у клітинах листкової пластинки *F. antipyretica*. Іони металу виявлено всередині клітин листка, дещо вищий їх вміст виявлено у клітинах крайової зони листка. Однак, значна частина іонів металу локалізується на поверхні листка, можливо зв'язуючись у клітинних стінках.

Встановлено, що в умовах свинцевого стресу у клітинах водного моху *F. antipyretica* підвищується рівень перекисного окислення ліпідів мембран. Свідченням цього є зростання вмісту малонового диальдегіду, який слугує показником активності цього процесу.

Досліджено вплив свинцю на активність ферментів, що визначають антиоксидантний статус рослинного організму. Встановлено зростання активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази у пагонах *F. antipyretica*. Проведені дослідження свідчать, що висока функціональна активність основних компонентів антиоксидантної системи є одним із найважливіших механізмів захисту рослинного організму в умовах свинцевого стресу, що сприяє підвищенню його толерантності до дії полютанта.

ЛІТЕРАТУРА

1. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1986. – 1. – С. 16-20.

2. Моин В.М. Простой и специфический метод для определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело – 1985. – 12. – С. 724-726.

3. Мусиенко М.М., Паршикова Т.В., Славный П.С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии биохимии и экологи растений. – Фитосоциоцентр, 2001. – 200 с.

4. Чвари С., Андял Т., Штренгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. – 1991. – 3. – С. 95-99.

5. Cho M., Chardoness A.N., Dietz K.J. Differential heavy metal tolerance of *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*: a leaf slice test // New Phytol. – 2003. – 158. – P. 287-293.

6. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // Planta. – 2001. – 212. – P. 475-486.

7. Baker A.J., Evart K., Hendry G.A., Thorpe P.C., Walker P.L. The evolutionary basis of cadmium tolerance in higher plants // 4-th International Conference of Environmental Contaminations (Barcelona, Spain). – 1990. – P.23-29.

8. Barkasdjieva N.T., Chrostov K.N., Christina K.N. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase // Biol. Plant. – 2000. – 43. – P. 73-78.

9. Bowler C., Van Montagu M., Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance // Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1994. – 43. – P. 83-116.

10. Bredford W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248-252.

11. Dixit V., Pandey V, Shyam R. Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea // J. Exp. Bot. – 2001. – 52. – P. 1102-1109.

12. Foyer C.H., Lelandais M., Galap C., Kunert K.J. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling // Physiologia Plantarum. – 1997. – 100. – P. 241-254.

13. Hall J.L. Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance // J. Exp. Bot. - 2002. – 53. – P. 1-11.

14. Seregin I.V., Ivanov V.B. Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants // Russian Journal of Plant Physiol. – 1997. – 44, 6. – P. 791-796.

15. Yenne S.P., Hatzios K. Influence of oxime ether on glutathione content and glutatione-related enzyme activity in seeds and seedlings of grain sorghum // Z. Naturforsch. – 1990. – 45. – 96-106.

16. Wilkins D.S. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth // New Phytol. – 1978. – 80, 3. – P. 623-633.