

ANNA H. MICAL, ROMUALD CZERPAK, AGNIESZKA KROTKE

*Instytut Biologii Filii UW w Białymstoku
ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok*

WPLYW OŁOWIU NA NIEKTÓRE PROCESY METABOLICZNE ROŚLIN

WSTĘP

Niepokój budzi od lat zwiększające się obciążenie środowiska metalami. Wiele jonów metali jest niezbędnych do tworzenia struktur komórkowych i prawidłowego metabolizmu. Są jednak metale, zwłaszcza ciężkie, zagrażające życiu. Stwierdzenie, kiedy dany metal jest pierwiastkiem niezbędnym do życia a kiedy trucizną, zależy głównie od jego stężenia, organizmu i jego zdolności detoksykacyjnych. Zaskoczeniem nieraz bywa skażenie metalami

terenów nieuprzemysłowionych i typowo rolniczych.

Celem pracy jest przedstawienie szkodliwego działania ołowiu na procesy fizjologiczno-metaboliczne roślin. W pracy omówiono źródła skażenia gleby ołowiem, drogi jego wnikania do roślin i kumulacji w nich oraz szkodliwe działanie ołowiu na przebieg fotosyntezy, oddychania, strukturę i syntezę kwasów nukleinowych oraz przyswajania azotu.

SKAŻENIE GLEBY

Źródła skażenia środowiska metalami są dwa: naturalne — wietrzenie skał, wybuchy wulkanów oraz antropogeniczne, spowodowane działaniem człowieka — emisje przemysłowe, paleniska domowe, nawozy sztuczne i środki ochrony roślin. Rozprzestrzenianie różnego rodzaju zanieczyszczeń w środowisku odbywa się w układzie: powietrze, do którego są emitowane pyły i gazy, woda i gleba, na które opadają cząstki zanieczyszczeń z powietrza lub spływają z wodami opadowymi, powierzchniowymi i przenikają w głąb ziemi. Trzecim ogniwem układu rozprzestrzeniania trucizn w środowisku są rośliny i zwierzęta. Ostatecznym biorcą trucizn jest człowiek oddychający powietrzem, pijący wodę i odżywiający się pokarmem pochodzenia roślinnego i zwierzęcego (KABATA-PENDIAS i PENDIAS 1989).

Gleba, mająca odpowiednie pH, może częściowo wiązać metale ciężkie. Gleby obojętne i bogate w próchnicę mogą wiązać więcej metali niż gleby kwaśne (KABATA-PENDIAS i PENDIAS 1989). Duże emisje tlenków siarki i azotu do atmosfery, pochodzące ze źródeł antropogenicznych, powodują powstawanie kwaśnych deszczów. Opadanie ich na ziemię prowadzi do

nadmiernego zakwaszenia gleby i zwiększonego pobierania jonów metali przez rośliny. Ogranicza się emisję kwaśnych zanieczyszczeń poprzez zmiany technologii przemysłowych, zakładanie filtrów na kominach fabrycznych i ograniczenie spalania paliw kopalnych. Zmniejsza się także ilość związków zasadowych powstających podczas ruchu pojazdów na nie utwardzanych drogach, w gospodarstwach rolnych i na placach budów. Kationy zasadowe (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) zmniejszają kwasowość już wilgotnego powietrza oraz neutralizują kwaśne roztwory glebowe (HEDIN i LIKENS 1997). Ujemnie naładowane cząstki ilów i humusu przyciągają kationy wapnia, potasu i magnezu i w ten sposób gleba gromadzi zapasy kationów zasadowych (BIAŁOBOK 1988, MERIAN 1991, VOLESKY 1993). Gdy kwaśne deszcze przenikają do gruntu, jony wapnia i magnezu zostają wyparte przez protony zdysocjowanych kwasów (H_2SO_4 , HNO_3), znajdujących się w kwaśnych opadach. Gleba zatrzymując jony wodoru obniża kwasność wody przesiąkającej w głąb gleby. Długotrwale, utrzymujące się przez wiele lat, kwaśne opady mogą doprowadzić do wyczerpania zapasów kationów zasadowych w glebie i buforujący

je mechanizm nie będzie skuteczny (HEDIN i LIKENS 1997). Straty wapnia i magnezu następują też w wyniku odprowadzania tych metali z plonami roślin uprawnych. Magnez i wapń przez zobojętnianie roztworu glebowego powodują obniżanie rozpuszczalności ołowiu i kadmu, zmniejszają ich ruchliwość i zdolność przemieszczania w roztworze, a więc ograniczają przyswajalność ich przez rośliny (KABATA-PENDIAS i PENDIAS 1989, BIEDA 1995).

Do naturalnych organicznych związków kompleksotwórczych należą substancje humusowe. Badania (CIEPAJ i WIERNY 1995) wykazały, że kwasy humusowe izolowane z torfu lub czar-

noziemiu tworzą bardzo trwałe połączenia metaloorganiczne z ołowiem, kadmem, cynkiem, miedzią co w efekcie prowadzi do zmniejszenia stężenia jonów metali w glebie. Grupy karboksylowe i obok nich, w położeniu orto, grupy hydroksylowe nadają związkom humusowym właściwości kompleksotwórcze a duża pojemność sorpcyjna wynika ze struktury polimerowej tych związków (MERIAN 1991, VOLESKY 1993). Kwasy huminowe tworzą z metalami związki kompleksowe i chelatowe. Do tworzenia kompleksów są konieczne jony Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} .

WNIKANIE OŁOWIU DO ROŚLIN

Rośliny pobierają składniki mineralne z roztworów glebowych w formie jonowej systemem korzeniowym. Rośliny 93%–96% kationów ołowiu wchłaniają i gromadzą w korzeniach. Ołów gromadzi się głównie w ścianach i błonach komórkowych strefy wydłużeniowej korzeni, zwiększa ich sztywność i zakłóca prawidłowy wzrost. Niskie stężenie ołowiu może działać stymulująco na wzrost korzeni, natomiast wyższe stężenie ołowiu zakłóca procesy podziału komórek, prowadząc w ten sposób do zmniejszenia ilości włókników, hamuje pobieranie wody i obniża wodnienie tkanek (KABATA-PENDIAS i PENDIAS 1979, NETO i DE VARENNES 1993). Gromadzenie ołowiu w ścianach i błonach komórkowych jest jednak mechanizmem obronnym. Ściana komórkowa pełni bowiem rolę bariery zatrzymującej kationy ołowiu i innych metali szkodliwych i nie pozwala na wnikanie ich do wnętrza protoplastu. Ołów, jako bardziej aktywny chemicznie, wypiera jony wapnia i magnezu z peptynianów blaszki środkowej ściany komórkowej i w ten sposób się kumuluje (KABATA-PENDIAS i PENDIAS 1989, WOŹNY 1995).

Jedną z dróg wnikania ołowiu do wnętrza komórek roślinnych może być pokonanie bariery błon komórkowych. Odbywać się to może przy udziale białek nośnikowych, endocytozy lub dyfuzji. W wyniku działania kationów ołowiu następują zmiany w strukturze fosfolipidów błonowych, powodujące zmiany przepuszczalności i selektywności błon. Błona komórkowa jest układem białkowo-lipidowym, na który wpływ ma protoplast i środowisko zewnętrzne. Selektywność w przepuszczalności błon zależy od ich składu chemicznego i stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych oraz składu i zawartości

steroli. Reakcje między ołowiem i fosfolipidami lub interakcje między ołowiem a wapniem, mogą być przyczyną zmian w strukturze i przepuszczalności błon. Pod wpływem ołowiu zachodzi też proliferacja retikulum endoplazmatycznego. Rozbudowa retikulum może być sposobem izolowania ołowiu, który przedostał się do wnętrza komórki od aktywnych metabolicznie struktur wewnątrzkomórkowych (WOŹNY 1995).

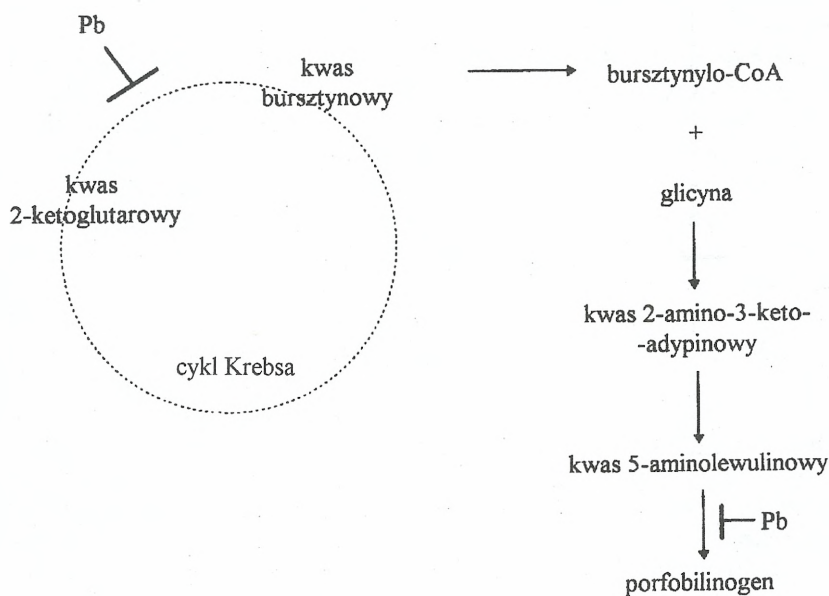
Na działanie ołowiu bardzo wrażliwy okazał się transport jonów potasowych oraz pompa H^+ -ATPaza. Ołów może wywoływać w roślinach stres wodny, który prowadzi do powstawania wolnych rodników ponadtlenkowych. Odpowiedzią roślin na działanie wolnych rodników jest wzrost poziomu dysmutazy ponadtlenkowej i zawartości karotenoidów, które uczestniczą w ich usuwaniu (PRZYMUSIŃSKI i GWÓŹDŹ 1994).

Jednym ze źródeł ołowiu jest, wciąż jeszcze dodawany do benzyny, czteroetylek ołowiu. Już w silniku samochodowym czteroetylek ołowiu podlega licznym przemianom chemicznym, w wyniku których powstaje wiele różnorodnych związków, często toksycznych halogenków. Czteroetylek, który nie uległ reakcjom chemicznym w silniku, jest emitowany wraz ze spalinami do atmosfery, gdzie przy udziale promieni ultrafioletowych przekształca się w bardzo toksyczny trójetylek ołowiu (WOŹNY 1995). Przekształcenie takie może też odbywać się w chloroplastach. Trójetylek ołowiu, podobnie jak i inne związki ołowiu, blokuje grupy -SH enzymów, wielu peptydów i białek aktywnych metabolicznie, hamuje fosforylację fotosyntetyczną (HAGER i współaut. 1987, WOŹNY 1995).

WPLYW OŁOWIU NA FOTOSYNTEZĘ

Substratem do syntezy układu porfiryнового, istotnego w hemoglobinie zwierząt i chlorofilu roślin, jest porfobilinogen. Tworzy się on z dwóch cząsteczek kwasu 5-aminolewulinowego, a reakcja jest katalizowana przez dehydrogenazę kwasu 5-aminolewulinowego (ALAD). U zwierząt ołów blokuje grupy -SH centrum katalitycznego enzymu i obniża jego aktywność, zaś u roślin ołów hamuje syntezę ALAD (ryc. 1).

białko LHCII, a kompleks chronią ksantofile. Ołów, powodując znaczne obniżenie zawartości chlorofilu, zakłóca tworzenie się błon tylakoidowych i gran oraz powoduje degradację apobiałek LHCPiI i LHCII. Zmiany te hamują swobodny przepływ elektronów w fotosystemie II, zmniejszają siłę asymilacyjną i wydajność procesu fotosyntezy (TERAO i KATOH 1989, DAHLIN 1988, WOŹNY 1995).

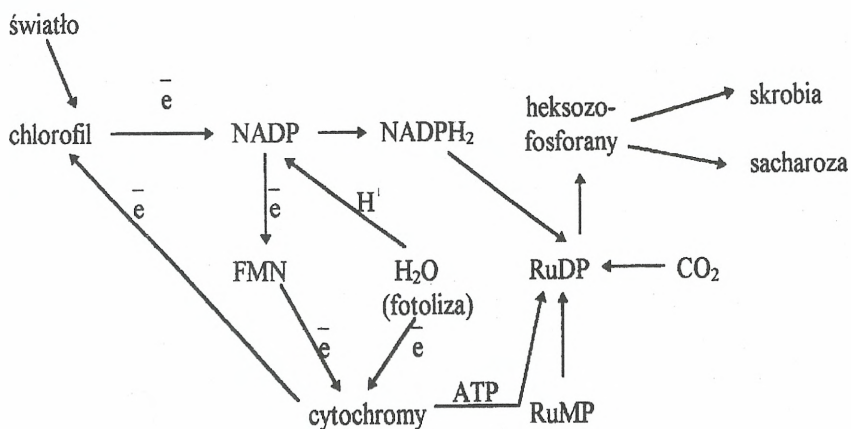


Ryc. 1. Uproszczony schemat syntezy porfobilinogenu. Strzałką ⊥ zaznaczono reakcje hamowania przez ołów.

Na skutek niedoboru ALAD obniża się zawartość chlorofilu, zakłóceniom ulega działanie fotosystemów oraz zmniejsza się siła asymilacyjna, to jest zawartość ATP i NADPH₂, i tempo asymilacji CO₂ (BURZYŃSKI 1987) (ryc. 2).

Białko fotosystemu II (LHCPiI) jest apobiałkiem skupiającym światło kompleksu chlorofil a/b. Musi ono być połączone z chlorofilem b. Jeżeli apobiałko nie jest połączone z chlorofilem b, ulega degradacji. Chlorofil a stabilizuje apo-

Stwierdzono też, że ołów powoduje słabsze otwieranie aparatów szparkowych, a tym samym zmniejsza dopływ CO₂ do wnętrza komórek. Ograniczenie asymilacji CO₂ jest powodem obniżenia poziomu metabolitów pochodzących z fotosyntetycznej redukcji związków węgla, głównie 3-fosfoglicerynianu, rybozy i rybulozy. Brak tych metabolitów uniemożliwia regenerację akceptora CO₂, którym jest rybulozo-1,5-bisfosforan (KRUPA i współaut. 1993).



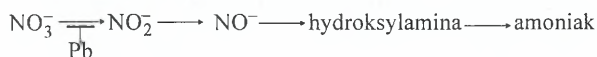
Ryc. 2. Uproszczony schemat fotosyntezy.

WPLYW OŁOWIU NA ODDYCHANIE I PRZYSWAJANIE AZOTU

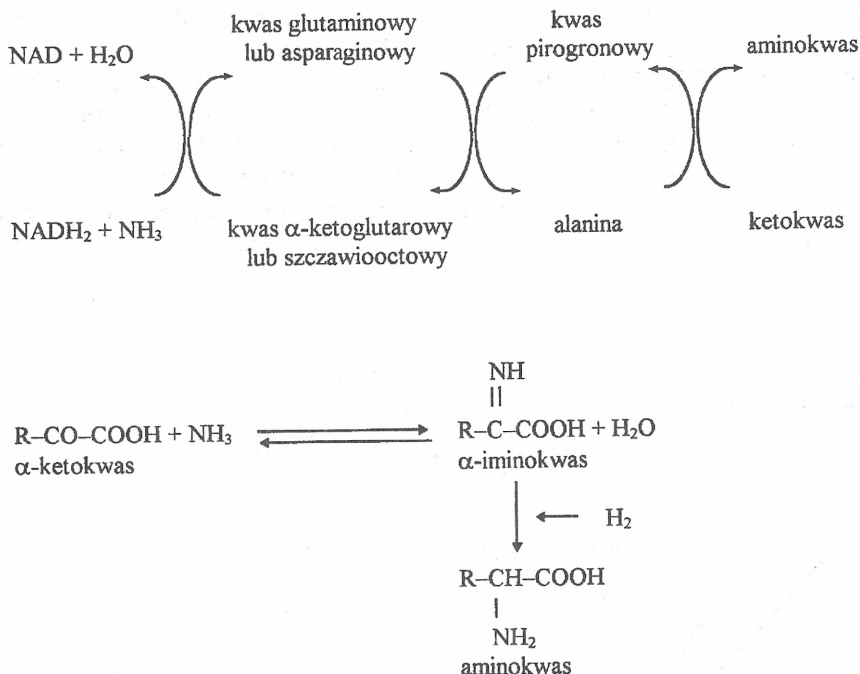
Na działanie ołowiu są bardzo wrażliwe mitochondria. Ołów powoduje zmniejszenie liczby grzebieni mitochondrialnych, co prowadzi do obniżenia wydajności fosforylacji oksydacyjnej. Nawet bardzo niskie stężenia ołowiu zaburzają utlenianie bursztynianu, ponieważ jest zahamowana aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (WOŻNY 1995). Zaburzenia oddychania mitochondrialnego powodują niedobór energii w komórce. Obroną roślin przed niedoborem energii i zakłóceniem oddychania mitochondrialnego jest wzmożona aktywność enzymów glikolitycznych i fermentacyjnych. Energia wytworzona w procesach fermentacyjnych rekompensuje niedobór ATP, powstały w wyniku ograniczonego oddychania mitochondrialnego.

U bakterii azotowych energia jest konieczna między innymi do wiązania azotu atmosferycznego. Rozerwanie wiązań w cząsteczce azotu (N≡N), a następnie jego redukcja wodorem wymaga dużego nakładu energii. Energię i wodór do redukcji azotu bakterie uzyskują z rozkładu pirogronianu. Wodór, przy udziale dehydrogenazy, jest aktywowany i za pośrednictwem ferredoksyny przenoszony na azot. Wiązanie azotu atmosferycznego przez bakterie brodawkowe dotyczy roślin motylkowych. Większość roślin wykorzystuje azot w formie soli azotanowych lub amonowych. Pompa protonowa H⁺-ATPaza usuwa protony wodoru na zewnątrz komórki, tworząc w ten sposób gradient protonów w pla-

zmolemmie i umożliwia napływ jonów azotanowych. Proces ten wymaga nakładu energetycznego w formie ATP i udziału enzymu — reduktazy azotanowej. W redukcji azotanów elektrony są przenoszone z NADH₂ przez FADH₂, cytochrom b₅₅₇ oraz kofaktor molibdenowy na azotan. Azotan ulega redukcji do azotynu (BUCZEK i MARCINIAK 1990).



Katalizująca reakcje reduktaza azotanowa jest jednak bardzo wrażliwa na działanie ołowiu. Enzym w centrach aktywnych zawiera grupy -SH, które są blokowane przez ołów. Reduktaza może też redukować azotany elektronami ze zredukowanego FMNH₂ przenoszonymi przez kofaktor molibdenowy. Przepływ elektronów przez domeny reduktazy azotanowej jest jednak bardzo utrudniony działaniem ołowiu, ponieważ aktywność enzymu jest obniżona, mimo że centra mogą pozostawać czynne (WOŻNY 1995). Azotan jest substratem i induktorem reduktazy azotanowej, ale ołów hamuje pobieranie azotanów i obniża aktywność enzymu uczestniczącego w jego redukcji (BURZYŃSKI 1988). Amoniak powstały w wyniku redukcji azotanów roślina wbudowuje w α-ketokwasy, głównie w kwasy α-ketoglutazarowy i szczawiooctowy, i w ten sposób włącza go w cykl przemian metabolicznych (ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat wykorzystywania przez rośliny amoniaku powstałego z redukcji azotanów.

WPLYW OŁOWIU NA KWASY NUKLEINOWE I BIAŁKA

Ołów łatwo może się wiązać z grupami fosforanowymi nukleotydów i kwasów nukleinowych. Wiążąc się z kwasami nukleinowymi, ołów powoduje agregację i kondensację chromatyny oraz stabilizację podwójnej helisy DNA. Działanie takie hamuje procesy replikacji i transkrypcji. Ołów może też prowadzić do destabilizacji DNA, rozrywając wiązania wodorowe między zasadami purynowymi i pirymidowymi, utrzymującymi strukturę podwójnej helisy. Autokatalityczna hydroliza RNA, spowodowana działaniem kationów ołowiu, jest przyczyną odłączenia protonu od grupy -OH rybozy. Degradacja RNA może też nastąpić w wyniku rozerwania ołowiem wiązań estrowych. DUAN i współpracownicy (1992) stwierdzili, że u roślin narażonych na działanie niskich stężeń ołowiu rzędu 10 µg/g, następował wzrost zawartości RNA i DNA. Obniżenie zawartości kwasów nukleinowych obserwowano po ekspozycji roślin na wysokie stężenia ołowiu (powyżej 20 µg/g). Obecność jonów wapnia i magnezu, zmiany pH oraz mechanizmy obronne roślin powodują, że aktywność i stężenie ołowiu w komórce mogą ulegać znacznym zmianom, a zatem i skutki działania kationu ołowiu mogą być różne (WOŹNY 1995).

Procesy detoksykacyjne są uzależnione między innymi od właściwej liczby i struktury kwasów nukleinowych. Metaloproteiny klasy I i II są produktami odpowiednich genów, a więc jest konieczna prawidłowa struktura kwasów nukleinowych do ich syntezy. Metaloproteiny klasy III nie są zależne od rybosomów i nie są syntetyzowane na podstawie informacji pochodzącej z mRNA. Metaloproteiny klasy III, zwane fitochelatynami, składają się z trzech amino-

kwasów: kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Strukturalnie są podobne do glutationu i nie wyklucza się, że glutation jest prekursorem fitochelatyn. Dwuaminokwasowy fragment (Glu-Cys) z donorowej formy glutationu zostaje przeniesiony na jego formę akceptorową. Proces jest katalizowany przez syntezę fitochelatynową. Dowodem, że glutation jest prekursorem metaloproteiny jest stwierdzenie *in vitro* zmniejszenia zawartości glutationu w komórkach po działaniu kadmem. Rośliny, które zawierają homoglutation zamiast glutationu, narażone na toksyczne działanie ołowiu, kadmu, produkują homofitochelatyny. W tych metaloproteinach w miejsce glicyny podstawiona jest β-alanina. Rośliny posiadające glutation i homoglutation wytwarzają oba rodzaje fitochelatyn (WOŹNY 1995).

Obecne w organizmach roślinnych i zwierzęcych metaloproteiny traktowano jako białko detoksykacyjne, wiążące i unieczynnające metale niekorzystnie działające na metabolizm. Zaobserwowano jednak, że rośliny wrażliwe na działanie ołowiu, kadmu wytwarzają więcej metaloprotein klasy III i szybciej tworzą kompleksy z metalami niż rośliny tolerujące te metale. Stosowane stężenie jonów metali było jednakowe, dla roślin wrażliwych i tolerujących je. W świetle tych obserwacji przyjęto, że metaloproteiny utrzymują homeostazę jonów metali zawsze występujących i niezbędnych w procesach fizjologiczno-metabolicznych komórki. Reakcje metaloprotein z ołowiem, kadmem i innymi metalami szkodliwymi są reakcjami wymuszonymi, o charakterze obronnym, prowadzącymi do unieczynnienia toksycznych jonów metali (WOŹNY 1995).

PODSUMOWANIE

Ołów wnika do roślin głównie systemem korzeniowym. Gromadzenie ołowiu w ścianach i błonach komórkowych może utrudniać pobieranie wody, ale może też być mechanizmem obronnym, podobnie jak i wiązanie metalu przez białka. Wniknięcie ołowiu do organeli komórkowych, aktywnych metabolicznie, po-

woduje zakłócenie w funkcjonowaniu fotosystemów, oddychania mitochondrialnego, przyswajania azotu oraz destabilizuje struktury kwasów nukleinowych i białek. Efekt toksycznego działania ołowiu zależy od jego stężenia w środowisku i wewnątrz komórki, obecności jonów wapnia, magnezu oraz pH środowiska.

THE INFLUENCE OF THE ENVIRONMENT CONTAMINATION BY LEAD ON PLANT METABOLISM

Summary

The absorption of lead ions by plants occurs mainly through the root system. Lead entering into root is accumulated in all cell compartments and has a toxic effect on

plant metabolism. Accumulation of lead in the cell membranes and walls decreases water absorption, especially by the elongation zone of the root. However, lead accumulation

in the cell wall may be a protective mechanism not permitting for lead transport into the cell. High level of lead within cell organelles affects photosynthesis, respiration, nitrogen assimilation and causes destabilisation of nucleic acids and

proteins. The effect of the toxic activity of lead depends on its concentration in the medium and within the cell, but it also depends on pH and on the presence of calcium and magnesium ions.

LITERATURA

- BIAŁOBOK S., 1988. *Wpływ zanieczyszczeń powietrza na roślinność*. LOP, Warszawa.
- BIEDA W., 1995. *Magnez i wapń antagonistami metali ciężkich w glebie i łańcuchu żywnościowym*. Materiały I Międzynarodowej Konferencji nt. Obieg pierwiastków w przyrodzie. Warszawa, 138–141.
- BUCZEK J., MARCINIAK J., 1990. *Reduktaza azotanowa i reduktaza azotynowa — kluczowe enzymy asymilacji azotanów w roślinach wyższych*. Wiad. Bot. 34, 19–32.
- BURZYŃSKI M., 1987. *Wpływ ołowiu na procesy fizjologiczne roślin*. Wiad. Bot. 31, 87–96.
- BURZYŃSKI M., 1988. *The uptake and accumulation of phosphorus and nitrates and the activity of nitrate reductase in cucumber seedlings treated with PbCl₂ or CdCl₂*. Acta Soc. Bot. Pol. 57, 349–359.
- CIEPAJ M., WIERNY A., 1995. *Preparaty dolomitowo-organiczne do kleszczowego wiązania jonów metali ciężkich występujących w glebie i wodzie w wyniku skażenia środowiska*. Materiały I Międzynarodowej Konferencji nt. Obieg pierwiastków w przyrodzie, Warszawa, 94–98.
- DAHLIN C., 1988. *Correlation between pigment composition and apoprotein of the light-harvesting complex II (LHCPII) in wheat (Triticum aestivum)*. Physiol. Plant. 74, 342–348.
- DUAN C., WANG H., QU Z., 1992. *Studies on the effect of heavy metals on the contents of nucleic acids and activities of nucleases in the root tips of Vicia faba*. Chinese J. Environm Sc (Beijing) 13, 31–35.
- HAGER A., MOSER J., BERTHOLD W., 1987. *Ogranolead toxicity in plants: triethyl lead (Et₃Pb⁺) acts as a powerful trans-membrane Cl⁻/OH⁻ exchanger dissipating H⁺ -gradients at nanomolar levels*. Z. Naturforsch. 42c, 1116–1120.
- HEDIN L. O., LIKENS G. E., 1997. *Pył atmosferyczny i kwaśny deszcz*. Świat Nauki 2, 54–58.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H., 1979. *Pierwiastki śladowe w środowisku biologicznym*. Wydawnictwo Geologiczne, Warszawa.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H., 1989. *Trace Elements in Soils and Plants*. CRS Press, Boca Raton, Florida.
- KRUPA Z., QUIST G., HUNER N. P. A., 1993. *The effects of cadmium on photosynthesis of Phaseolus vulgaris — a fluorescence analysis*. Physiol. Plant. 88, 626–630.
- MERIAN E., (red.) 1991. *Metals and Their Compounds in the Environment*. VCH, Weinheim, New York, Cambridge.
- NETO N. M. P. M., DE VARENNES A., 1993. *Determination of lead in white lupin by anodic stripping voltammetry*. Plant and Soil 154, 1–5.
- PRZYMUSIŃSKI R., GWÓZDŹ E. A., 1994. *Increased accumulation of the 16 * 10³ Mr polipeptide in lupin roots exposed to lead, copper and nitride ions*. Environm. Exp. Bot. 34, 63–68.
- TERAO T., KATOH S., 1989. *Synthesis and breakdown of the apoprotein of light-harvesting chlorophyll a/b protein in chlorophyll b-deficient mutant of rice*. Plant. Cell Physiol. 30, 571–580.
- VOLESKY B., (red.) 1993. *Biosorption of Heavy Metals*. CRS Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston.
- WOŹNY A., 1995. *Ołów w komórkach roślinnych. Pobieranie. Reakcje. Odporność*. Sorus, Poznań.