

УДК 574.24

Н. А. Матвеева, В. П. Дуплій, В. О. Панов

### ВІДНОВЛЕННЯ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМУ РОСЛИНАМИ РЯСКИ В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Досліджено особливості культивування ряски *Lemna minor* L. в умовах *in vitro* в присутності Cr(VI). Пригнічувальна дія хрому залежала від його концентрації та була мінімальною при вмісті Cr(VI) 50—75 мг/л. Приріст кількості листеців лінійно зменшувався при підвищенні концентрації хрому від 50 до 400 мг/л. Протягом культивування відбувалося відновлення у середовищі шестивалентного хрому до Cr(III); транспортування Cr(VI) до рослинних клітин і відновлення Cr(VI) до Cr(III) безпосередньо в рослинах. Час зменшення вмісту Cr(VI) у середовищі до нуля залежав від вихідної концентрації (50...200 мг/л) та становив 6—10 діб при співвідношенні кількість листеців/об'єм середовища (мл), що дорівнювало 10/1.

**Ключові слова:** *Lemna minor* L., Cr(VI), культивування *in vitro*.

Існуюча у світі проблема забруднення навколишнього середовища продуктами антропогенного походження викликає посилений інтерес до вивчення впливу токсичних сполук на живі організми, у тому числі рослини, та розроблення технологій очищення довкілля. Викиди у повітря та у водойми токсичних металів як одного із забруднювачів негативно впливають на ріст рослин, викликаючи анатомічні та морфологічні зміни, порушення фізіологічних і біохімічних процесів. Разом з тим, рослини не тільки є об'єктом, на який діють токсичні сполуки, але й можуть стати засобом боротьби із забрудненням довкілля завдяки наявності природних механізмів детоксикації шкідливих сполук та використовуватись для фіторе mediaції ґрунтів і водойм [23, 24].

Концентрації різних металів, що є токсичними для рослин, відрізняються у значній мірі [10]. Вміст найбільш токсичних сполук ртуті, наприклад, для *Lemna minor*  $LD_{50}$   $Hg^{2+}$  становить близько 0,6 мг/л. Умови культивування (температура, рН тощо) впливають на біоаккумуляцію токсичних металів та виживання рослин [8]. Очищення забруднених токсичними металами водойм та ґрунтів можливе шляхом кількох природних механізмів: фітоекстракції, фітовипаровуванню, фітостабілізації та фітофільтрації [23]. Відповідь рослин на дію токсичних металів полягає перш за все в акумулюванні токси-

© Н. А. Матвеева, В. П. Дуплій, В. О. Панов, 2013

кантів у клітинах [7, 8, 16, 27, 28] та активізації системи антиоксидантного захисту [21, 22],

Сполуки три- та шестивалентного хрому потрапляють у водойми як внаслідок природних процесів, так і при антропогенному забрудненні стічними водами гальванічних і красильних цехів, з виробництва шкіри та ін. Вміст хроматів у водоймах для побутового використання не повинен перевищувати ГДК для Cr(VI) 0,05 мг/дм<sup>3</sup>, для Cr(III) 0,5 мг/дм<sup>3</sup> [3]. Фітотоксичність сполук Cr(VI) полягає у пригніченні проростання насіння, росту рослин, порушенні фотосинтезу, ультраструктури мембран, водного балансу, вмісту пігментів, викликає оксидативний стрес [11, 20, 25, 27].

Рослини різних родин (Brassicaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Fabaceae, Caryophyllaceae, Lemnaceae тощо) здатні до гіперакумуляції токсичних металів [13, 15]. Використання ряски як природного фіторе-медіатора забруднених водойм становить інтерес, оскільки ця рослина відзначається невибагливістю до живильних компонентів, швидким приростом біомаси та стійкістю до токсичних сполук [5, 6, 12, 14, 18, 19].

Відомо, що рослини з модифікованим геномом можуть відрізнятися від рослин дикого типу за зовнішнім виглядом та фізіологічними характеристиками. Раніше нами було створено трансгенні рослини ряски, що мали гени туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag85B, та проведено дослідження їхніх відмінностей від вихідних рослин, у тому числі за стійкістю до токсичних металів. У даній роботі наведено результати частини цих досліджень щодо стійкості ряски дикого типу (нетрансформованих) до сполуки шестивалентного хрому.

**Матеріал і методика досліджень.** Об'єктом досліджень слугували рослини ряски *L. minor*, які культивували у стерильних умовах на модифікованому середовищі Мурасіге та Скуга (таблиця) [17] з вмістом Cr(VI): 0, 50, 75, 100, 150, 200, 400 мг/л (відповідно варіанти 1—7). У чашки Петрі діаметром 60 мм додавали по 10 мл рідкого середовища з відповідною концентрацією Cr(VI) та переносили до чашок ряску (по 100 листеців). Через 3, 6, 10 та 17 діб проводили підрахунок кількості листеців та визначали: приріст кількості листеців ( $\Delta N = N_i - N_0$ ), де  $N_0$  — початкова кількість листеців,  $N_i$  — кількість через 3, 6, 10 або 17 діб; логарифмічний коефіцієнт росту  $\mu = (\ln N_i - \ln N_0) / t_i$ , де  $N_i$  — кількість листеців через певний проміжок часу ( $i = 3, 6, 10, 17$  діб),  $N_0$  — початкова кількість листеців ( $N_0 = 100$ ),  $t_i$  — час від початку експерименту; концентрацію Cr (VI); час подвоєння кількості листеців  $t_{\text{подв}} = \ln 2 / \mu$ .

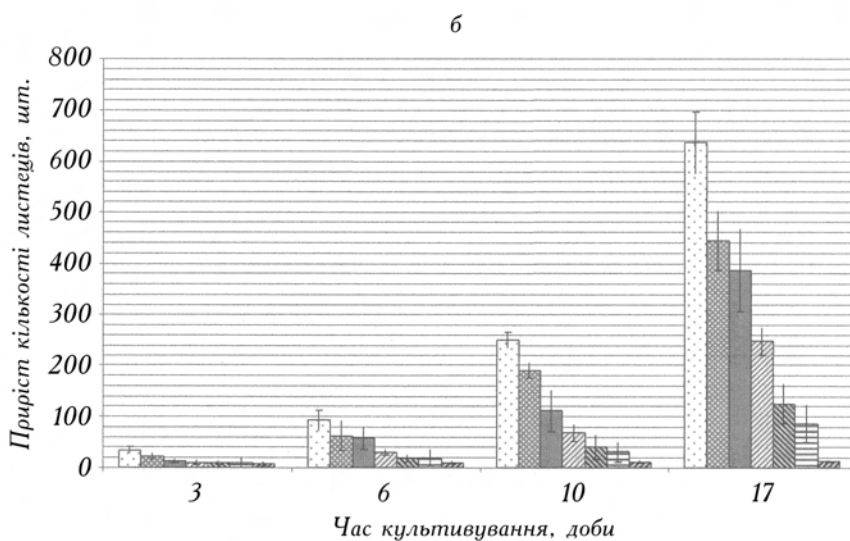
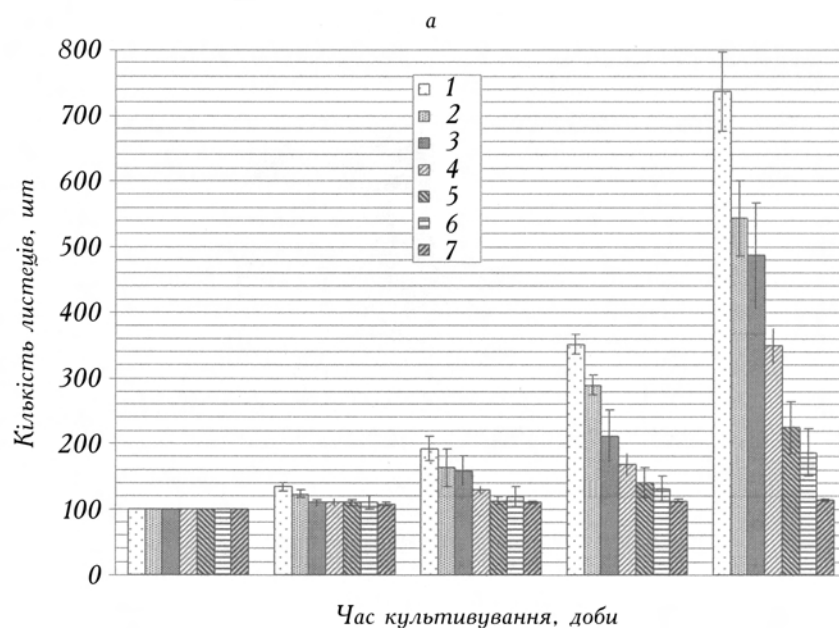
Концентрацію Cr(VI) у живильному середовищі визначали з використанням дифенілкарбозиду на спектрофотометрі Erpendorf bioPhotometer plus за методикою [2]. Для визначення вмісту Cr(VI) у рослинах 100 мг листеців гомогенізували у ступці, додавали 1 мл дистильованої води, центрифугували; у супернатанті визначали вміст хрому. Експерименти проводили у трьох повторностях, статистичну обробку результатів здійснювали за стандартними методиками [1].

**Склад модифікованого середовища Мурасіге та Скуга, яке було використано для культивування рослин в умовах *in vitro***

Компоненти	Концентрація компонентів у середовищі, мг/л
KNO <sub>3</sub>	950,000
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	220,000
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	190,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825,000
KI	0,830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	24,100
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,600
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
CoSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> ЕДТА	37,300
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,800
Мезоінозит	100,000
Тіамін	0,500
Піридоксин	0,500
Нікотинова кислота	5,000
Фолієва кислота	0,500
Гліцин	2,000
Біотин	0,050
Цукроза	20000,000

***Результати досліджень та їх обговорення***

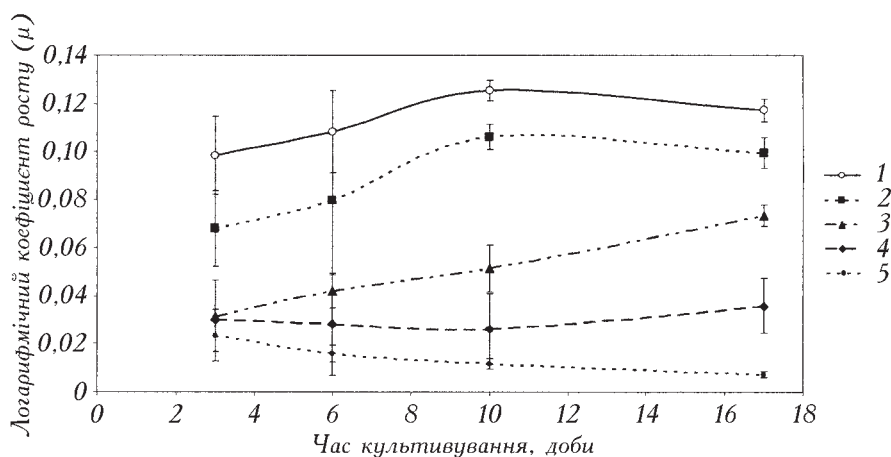
Потягом усього часу спостережень, як і очікувалося, найбільшим був приріст кількості листеців у контрольних варіантах (рис. 1). При культивуванні протягом нетривалого часу (3 доби) приріст листеців у варіантах експерименту, що різнилися за концентрацією хрому в межах 75...400 мг/л, становив 7—10. Зі збільшенням часу культивування у стресових умовах виявлялися відмінності в рості рослин при різних концентраціях токсичної сполуки. Так, через 6 діб ріст на середовищах, що містили до 75 мг/л Cr(VI), вірогідно не відрізнявся від росту контрольних рослин — приріст становив відповідно 62 та 58 листеців. Більші концентрації пригнічували ріст, що



1. Кількість (а) та приріст кількості (б) листеців протягом 3—17 діб культивування ряски в присутності 0 (1), 50 (2), 75 (3), 100 (4), 150 (5), 200 (6) та 400 (7) мг/л Cr(VI).

відбивалося на прирості кількості листеців, який становив 29, 18, 19, 10 шт. на середовищах з 100, 150, 200 та 400 мг/л Cr(VI) відповідно.

При максимальному терміні культивування (17 діб) закономірно найбільшим виявився приріст рослин у контролі — 636, найменшим — у варіанті 7. Концентрація 400 мг/л виявилася високотоксичною, адже не тільки приріст рослин виявився незначним, а й лише 20% рослин залиши-



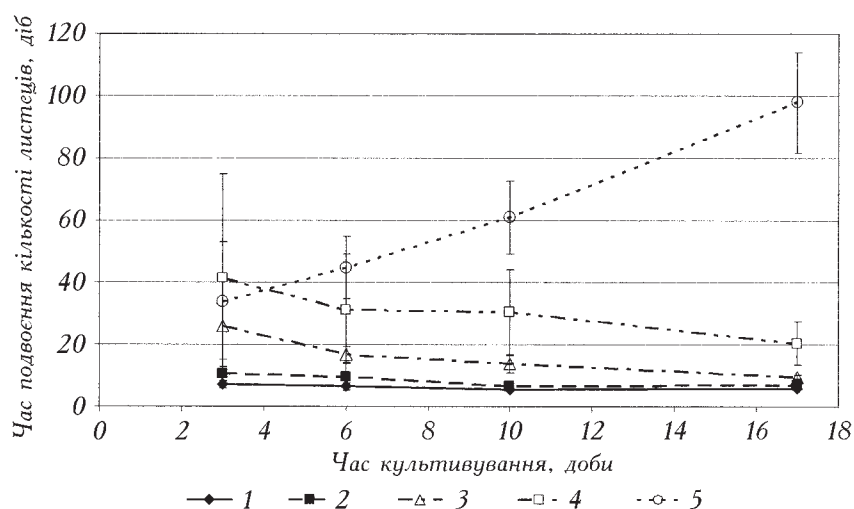
2. Логарифмічний коефіцієнт росту ( $\mu$ ) ряски у середовищі з Cr(VI) у концентрації 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4) і 400 (5) мг/л.

лись живими. В той же час при вмісті 50—75 мг/л Cr(VI) кількість листеців через 17 діб була лише у 1,4—1,6 разів меншою, ніж в контролі. Приріст листеців лінійно зменшувався (коефіцієнт кореляції  $r = -0,95$ , похибка коефіцієнта кореляції  $S_r = 0,08$ ) при підвищенні концентрації хрому від 0 до 200 мг/л.

Слід зазначити, що концентрація 50—100 мг/л практично не змінювала зовнішній вигляд рослин (розміри, забарвлення), в той же час підвищення вмісту хрому до 200 та 400 мг/л призводило не лише до пригнічення росту рослин, але й до появи хлорозу та некрозу (при 400 мг/л) листеців.

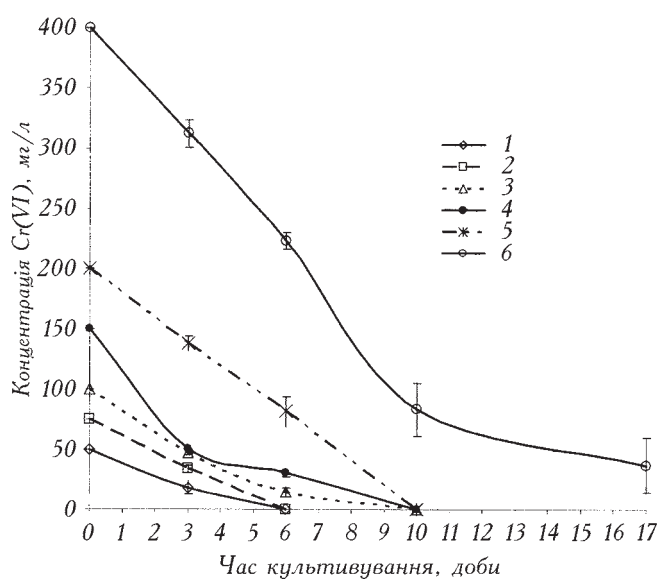
Логарифмічний коефіцієнт росту  $\mu$  дає можливість оцінити токсичність сполуки по відношенню до досліджуваних рослин. В наших експериментах при мінімальній з тестованих концентрацій (50 мг/л) цей коефіцієнт становив 0,068—0,106 (рис. 2). Збільшення вмісту хромату підвищувало його токсичний вплив на рослини, що видно зі зменшення  $\mu$ , особливо значного при високих концентраціях Cr(VI).

Як і слід було очікувати, час подвоєння кількості листеців ( $t_{\text{подв}}$ ) у контролі протягом культивування майже не змінювався і становив 6—7 діб, що свідчить про однакову відсутність негативного впливу протягом цього періоду (рис. 3). На всіх середовищах із початковою концентрацією від 50 до 200 мг/л  $t_{\text{подв}}$  мав тенденцію до зменшення протягом експерименту, що, вочевидь, пояснюється зменшенням концентрації токсиканту в середовищі. Характер зміни  $t_{\text{подв}}$  при 400 мг/л Cr(VI) є іншим — коефіцієнт збільшується з часом. На 17-ту добу  $t_{\text{подв}}$  становив  $5,9 \pm 0,2$ ,  $7,0 \pm 0,4$ ,  $8,0 \pm 1,1$ ,  $9,5 \pm 0,6$ ,  $15,1 \pm 3,3$ ,  $20,5 \pm 7,0$ ,  $97,9 \pm 16,2$  діб для початкової концентрації шестивалентного хрому 0, 50, 75, 100, 150, 200, 400 мг/л відповідно.



3. Час подвоєння листяців ряски у середовищі з вмістом Cr(VI): 0 (1) 50 (2), 100 (3), 200 (4) та 400 (5) мг/л.

Зменшення вмісту хрому у середовищі спостерігали уже через 3 доби в усіх варіантах експерименту (рис. 4). Так, на цей період вміст хрому становив 18,34; 34,29; 47,49; 50,63; 81,44 та 317,37 мг/л відповідно вихідним концентраціям 50, 75, 100, 150, 200 та 400 мг/л Cr(VI). Візуальною ознакою відсутності шестивалентного хрому у середовищі була зміна кольору середовища, а саме, зникнення характерного жовтого забарвлення. Через 6 діб шестивалентний хром був відсутній у двох варіантах (50 та 75 мг/л), а через 10 діб — ще у трьох (100, 150 та 200 мг/л). Тільки при найвищій вихідній концентрації (400 мг/л) жовте забарвлення середовища залишалося навіть через 17 діб, а аналіз виявив присутність Cr(VI) у концентрації 37,19 мг/л.



4. Динаміка зменшення концентрації Cr(VI) у середовищі при культивуванні рослин ряски протягом 17 діб: 1, 2, 3, 4, 5, 6 — відповідно 50, 75, 100, 150, 200 і 400 мг/л.

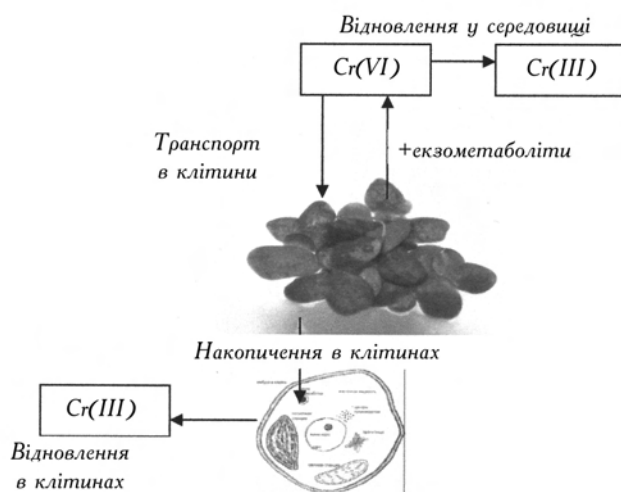
Слід зазначити, що у варіантах № 2—7 з'являвся нерозчинний у воді осад зеленувато-блакитного кольору, що є наслідком появи у середовищі сполук тривалентного хрому. Отже, при рості ряски відбувалося відновлення Cr(VI) до Cr(III).

Аналіз водних екстрактів з рослин через 17 діб культивування показав відсутність Cr(VI) у варіантах № 2 та 3 та наявність Cr(VI) у № 4—6 в концентрації 0,08—0,30 мг/г маси рослин.

Необхідною та достатньою умовою для неспецифічного відновлення металів організмами є різниця потенціалів у 150 мВ між донорною та акцепторною системами [4]. Ефективність цього процесу залежить від кількості біомаси та площі контакту між токсичними сполуками та рослинами. Відомо, що стандартний потенціал реакції відновлення хромат-аніону до гідроксиду хрому(III) становить +555 мВ:



Виходячи з термодинаміки процесу, можливим є відновлення хрому до тривалентного як у середовищі, так і всередині клітин. Відновлення у середовищі відбувається, зокрема, внаслідок наявності органічних сполук — екзометаболітів рослин. Цим пояснюється той факт, що збільшення співвідношення кількості рослин/об'єм середовища при незмінній концентрації хромату приводить до значного підвищення виживання рослин. Так, проведені нами експерименти показали, що при початковій кількості листеців 10 шт на 10 мл середовища токсичною є концентрація Cr(VI) 50 мг/л, в той час як збільшення вихідної кількості до 100 листеців значно підвищує виживання рослин.



5. Процеси, що відбуваються при культивуванні ряски у середовищі з Cr(VI).

У процесі відновлення шестивалентного хрому також беруть участь органічні сполуки зруйнованих через токсичну дію хрому клітин. Очевидно, саме цей механізм вносить вклад у зменшення концентрації Cr(VI) у живильному середовищі у варіанті № 7 (початкова концентрація 400 мг/л), у якому приріст листеців був незначним, спостерігалися хлорози та некрози.



Оскільки йонний радіус хромат-аніона близький до йонних радіусів аніонів  $\text{SO}_4^{2-}$  та  $\text{PO}_4^{3-}$  (відповідно 0,300, 0,295 та 0,300), відбувається неспецифічний транспорт хромат-аніону до клітин, де також здійснюється відновлення до хрому(III). У даному випадку донорною системою слугували клітини рослин, акцепторною — хромат.

Таким чином, очевидно, що при культивуванні ряски в умовах стресу, викликаного наявністю шестивалентного хрому, відбувається декілька процесів (рис. 5):

1. Виділення у середовище екзометаболітів, які відновлюють частину Cr(VI) до Cr(III), про що свідчить поява зеленуватого осаду.

2. Транспортування Cr(VI) до рослинних клітин та накопичення Cr(VI) в рослинах (зафіксовано наявність Cr(VI) у суспендованих клітинах).

3. Відновлення Cr(VI) до Cr(III) безпосередньо в рослинах.

### Висновки

Виявлено, що Cr(VI) пригнічує ріст ряски в умовах *in vitro*. Пригнічувальна дія хрому залежала від його концентрації у середовищі та була найменшою при вмісті Cr(VI) 50—75 мг/л. Приріст кількості листеців на сімнадцяту добу лінійно зменшувався при підвищенні концентрації хрому від 50 до 200 мг/л. Час подвоєння кількості листеців за відсутності хрому становив 6—7 діб, був більшим при додаванні Cr(VI) та мав тенденцію до зменшення при відновленні Cr(VI) в середовищі.

При культивуванні в умовах *in vitro* ряски в присутності Cr(VI) відбувається відновлення у середовищі шестивалентного хрому до Cr(III); транспортування Cr(VI) до рослинних клітин і накопичення його в клітинах; відновлення Cr(VI) до Cr(III) безпосередньо в рослинах. Час зменшення вмісту Cr(VI) у середовищі до нуля залежав від вихідної концентрації (50...200 мг/л) та становив 6—10 діб. При концентрації Cr(VI) 400 мг/л повного очищення середовища не спостерігалось, хоча концентрація у 10 разів зменшувалася.

Отже, при концентрації 50—75 мг/л Cr(VI) відбувається ріст ряски, хоча і повільніше, ніж у контролі; за таких умов рослини відновлюють Cr(VI), що може бути використано у природоохоронних біотехнологіях. При цьому має значення співвідношення маси (кількості) рослин та загальної кількості хрому. Концентрації 200 мг/л і вище є токсичними для рослин при використовуваному співвідношенні кількості рослин / концентрація Cr(VI) / об'єм середовища та спричинюють їх загибель.

\*\*

*Исследованы особенности роста ряски Lemna minor L. в присутствии шестивалентного хрома в условиях in vitro. Токсичное действие хрома зависело от его концентрации и было минимальным при содержании Cr(VI) 50—75 мг/л. Прирост количества листецов уменьшался при повышении концентрации хрома от 50 до 400 мг/л.*



При культивировании в условиях *in vitro* ряски в присутствии Cr(VI) происходило восстановление в среде Cr(VI) до Cr(III); транспортирование Cr(VI) в растения и восстановление Cr(VI) до Cr(III) непосредственно в растениях. Время уменьшения содержания Cr(VI) в среде до нуля зависело от исходной концентрации (50...200 мг/л) и составляло 6—10 сут при соотношении количество листочков/объем среды в мл 10/1.

\*\*

*Lemna minor* L. *in vitro* growth characteristics at the presence of Cr(VI) have been investigated. Toxic effect of hexavalent chromium depended on Cr(VI) concentration. The frond number gain decreased with increasing of Cr(VI) concentration from 50 up to 400 mg/l. During *in vitro* cultivation of duckweed the reduction of Cr(VI) to Cr(III) in the medium; Cr(VI) transportation into the duckweed plants and reduction of Cr(VI) up to Cr(III) in cells have been observed. Time of decreasing of Cr(VI) concentration in the medium to zero depended on initial concentration (50...200 mg/l) of the metal and amounted to 6—10 days at ratio of frond number/volume (ml) of medium in 10/1.

\*\*

1. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
2. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. — М.: Химия, 1979. — 480 с.
3. Сборник санитарно-гигиенических нормативов и методов контроля вредных веществ в объектах окружающей природной среды. — М.: Искусство, 1991. — 370 с.
4. Таширев А.Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами // Микробиол. журн. — 1994. — Т. 56, № 6. — С. 89—100.
5. Ater M., Ait Ali N., Kasmir H. Tolerance and accumulation of copper and chromium in two duckweed species: *Lemna minor* L. and *Lemna gibba* L. // Rev. Sci. Eau. = J. Water Sci. — 2006. — Vol. 19, N 1. — P. 57—67.
6. Axtell N.R., Sternberg S.P.K., Claussen K. Lead and nickel removal using *Micrrospora* and *Lemna minor* // Bioresource Technol. — 2003. — Vol. 89, N 1. — P. 41—48.
7. Dirilgen N. Effects of pN and chelator EDTA on Cr toxicity and accumulation in *Lemna minor* // Chemosphere. — 1998. — Vol. 37, N 4. — P. 771—783.
8. Dirilgen N. Mercury and lead: assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor* // Ecotoxicol. Environ. Safety. — 2011. — Vol. 74, N 1. — P. 48—54.
9. Driever S.M., van Nes E.H., Roijackers R.M. Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density // Aquatic Botany. — 2005. — Vol. 81, N 3. — P. 245—251.
10. Drost W., Matzke M., Backhaus T. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure // Chemosphere. — 2007. — Vol. 67, N 1. — P. 36—43.

11. Ganesh K.S., Baskaran L., Rajasekaran S. et al. Chromium stress induced alterations in biochemical and enzyme metabolism in aquatic and terrestrial plants // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. — 2008. — Vol. 63, N 2. — P. 159—163.
12. Jain S., Vasudevan P., Jha N. *Azolla pinnata* R.Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water // *Water Res.* — 1990. — Vol. 24, N 2. — P. 177—183.
13. Kraemer U. Phytoremediation to phytochelatin — plant trace metal homeostasis // *New Phytologist*. — 2003. — Vol. 158, N 1. — P. 4—6.
14. Körner S., Vermaat J.E., Veenstra S. The capacity of duckweed to treat wastewater: ecological considerations for a sound design // *J. Environ. Qual.* — 2003. — Vol. 32, N 5. — P. 1583—1590.
15. Mkandawire M., Dudel E.G. Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents? // *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*. — 2007. — Vol. 1, N 1. — P. 56—71.
16. Mukherjee S., Mukherjee S., Bhattacharyya P., Duttagupta A.K. Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies // *Environ. Intern.* — 2004. — Vol. 30, N 6. — P. 811—814.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. — 1962. — Vol. 15, N 3. — P. 473—497.
18. Nhapi I., Dalu J., Ndamba J. et al. An evaluation of duckweed-based pond systems as an alternative option for decentralised treatment and reuse of wastewater in Zimbabwe // *Water Sci. Technol.* — 2003. — Vol. 48, N 2. — P. 323—330.
19. Ozengin N., Elmaci A. Performance of duckweed (*Lemna minor* L.) on different types of wastewater treatment // *J. Environ. Biol.* — 2007. — Vol. 28, N 2. — P. 307—314.
20. Panda S.K., Choudhury S. Chromium stress in plants // *Braz. J. Plant Physiol.* — 2005. — Vol. 17, N 1. — P. 95—102.
21. Razinger J., Dermastia M., Drinovec L. et al. Antioxidative responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term copper exposure // *Environ. Sci. and Pollution Res. Intern.* — 2007. — Vol. 14, N 3. — P. 194—201.
22. Sanita di Toppi L., Fossati F., Musetti R. et al. Effects of hexavalent chromium on maize, tomato, and cauliflower plants // *J. Plant Nutrition*. — 2002. — Vol. 25, N 4. — P. 701—717.
23. Sarma H. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology // *J. Environ. Sci. Technol.* — 2011. — Vol. 4, N 2. — P. 118—138.
24. Shah K., Nongkynrih J.M. Metal hyperaccumulation and bioremediation // *Biologia Plantarum*. — 2007. — Vol. 51, N 4. — P. 618—634.
25. Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants // *Environ. Intern.* — 2005. — Vol. 31, N 5. — P. 739—753.

26. *Teisseire H., Guy V.* Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*) // *Plant Sci.* — 2000. — Vol. 153, N 1. — P. 65—72.
27. *Uysal Y., Taner F.* Bioremoval of cadmium by *Lemna minor* in different aquatic conditions // *CLEAN — Soil, Air, Water.* — 2010. — Vol. 38, N 4. — P. 370—377.
28. *Xing W., Huang W., Liu G.* Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid // *Environ. Toxicol.* — 2010. — Vol. 25, N 2 — P. 103—112.

Інститут клітинної біології та генетичної  
інженерії НАН України, Київ

Надійшла 28.03.12