

KRÓTKOCZASOWA EKSPOZYCJA GLONÓW SŁODKOWODNYCH NA ORGANICZNE ZWIĄZKI OŁOWIU – NIEINWAZYJNE BADANIA ELEKTRYCZNE I LUMINESCENCYJNE

Robert Borc¹, Anna Jaśkowska², Andrzej Dudziak²

¹ Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Lubelska, ul. Nadbystrzycka 40B, 20-618 Lublin, e-mail: r.borc@pollub.pl

² Wydział Elektrotechniki i Informatyki, Politechnika Lubelska, ul. Nadbystrzycka 36, 20-618 Lublin

STRESZCZENIE

W pracy zastosowano dwie różne biofizyczne metody badawcze celem sprawdzenia czy są one dostatecznie czułe na wykrywanie absorpcji jonów metali ciężkich przez makrofity wodne (makroalgi *Nitellopsis obtusa*) w krótkim czasie po ich ekspozycji na działanie tych jonów. Obie techniki pomiarowe są całkowicie nieinwazyjne, dzięki czemu można je stosować *in vivo*. Pierwsza z tych technik to monitorowanie parametrów elektrycznych roślin za pomocą zmiennoprądowego mostka elektrycznego przy użyciu czterech elektrod zewnętrznych w roztworze (dwóch napięciowych i dwóch prądowych). Druga technika pomiarowa polega na rejestracji ultrasłabego (nie-widzialnego gołym okiem) promieniowania elektromagnetycznego (UWL) z tych roślin w zakresie od bliskiego ultrafioletu poprzez przedział widzialny do bliskiej podczerwieni. Do badań testowych użyto dwóch organicznych związków ołowiu, tj. octanu ołowiu i chlorotrimetylołowiu. Zmiany wartości parametrów elektrycznych jak i natężenia emisji fotonowej roślin świadczyły o poborze ołowiu przez rośliny z zanieczyszczonego środowiska. Możliwa była ocena czasu, po którym występowała absorpcja ołowiu powodująca zmiany w komórkach roślinnych na poziomie błon komórkowych, jak i oszacowanie tego poboru, który zależał od zastosowanego stężenia organicznych związków ołowiu. Wyniki badań pokazały interesującą zależność, a mianowicie, dla małych stężeń organicznych związków ołowiu w środowisku, tj. poniżej 1 mM, w czasie 5-cio godzinnej ekspozycji roślin na ich działanie, widoczne były wyraźne zmiany parametrów elektrycznych komórek roślinnych, podczas gdy ultrasłaba luminescencja tych roślin pozostawała na stałym poziomie. Przykładowo dla octanu ołowiu, potencjał spoczynkowy błony komórkowej w zakresie stężeń 0–100 μM zmieniał się od -140 mV do -175 mV, a rezystancja błony wzrastała 1,5 razy w stosunku do wartości wyjściowej dla stężeń od 12 do 50 μM . Dla stężeń związków ołowiu powyżej 1 mM, metoda elektryczna okazywała się mało przydatna, gdyż pojedyncze komórki ulegały szybkiemu załamaniu się w trakcie pomiarów. Intensywność ultrasłabego „świecenia” roślin dla wyższych stężeń octanu ołowiu dochodzących do 10 mM wzrastała gwałtownie (nawet czterokrotnie) w okresie pierwszych 20 minut ekspozycji. Natomiast dla chlorotrimetylołowiu efekt wzrostu UWL był bardzo łagodny i następował dopiero po około 40 minutach od momentu ekspozycji. Tak duże stężenia związków organicznych ołowiu w środowisku są czynnikiem wywołującym szok, stres organizmów roślinnych. Związany jest on najprawdopodobniej z gwałtowną erupcją wolnych rodników prowadzącą do peroksydacji lipidów i nieodwracalnymi zmianami letalnymi, jak sugeruje wielu autorów w literaturze naukowej. Szczegółowe badania biochemiczne w tym zakresie mogłyby pomóc w rozstrzygnięciu tego problemu.

Słowa kluczowe: ultrasłaba luminescencja, chemiluminescencja, *Nitellopsis obtusa*, ołów organiczny, opór błonowy, potencjał spoczynkowy

SHORT-TERM EXPOSURE OF FRESHWATER ALGAE TO LEAD ORGANIC COMPOUNDS STUDIED WITH NON-INVASIVE ELECTRICAL AND LUMINESCENT METHODS

ABSTRACT

In this paper the non-invasive biophysical methods were applied to assess the organic lead compounds absorption by freshwater algae *Nitellopsis obtusa*. Two biophysical techniques were used: the electrical method AC bridge with four external electrodes and the luminescent with the registration of ultraweak photon radiation

emitted by plants. They allow to study the electrical and luminescent cell membrane properties. Research was performed with the lead acetate and trimethyl-lead chloride to verify whether algae cells were able to absorb Pb ions from water medium contaminated by these compounds. When the concentration of lead acetate solution increased up to 0–100 μM the membrane resting potential changed from -140 mV to -175 mV. On the other hand, the electrical resistance of cell membrane (for 12–50 μM) increased with exposure time exceeding its starting value up to 1.5 times. In contrast to these electrical changes, the intensity of ultraweak luminescence was constant at concentrations below 1 mM lead acetate. These results with comparison of literature data can suggest that there was no lipid peroxidation in cell membranes for such organic lead compound concentrations. Chemiluminescent responses of algae were observed in the first 5 hours of experiments for lead concentration higher than 1 mM. The luminescence intensity increased immediately for both reagents, but no more than 4 times for concentrations of 1–10 mM lead acetate. For tetramethyl-lead chloride, the luminescence intensity started to increase slowly about 40 minutes after injection. These results with comparison of literature data may suggest lipid peroxidation in cell membrane for higher, toxic lead concentrations. It means that higher concentrations of lead can trigger lethal processes in the living cells. We conclude that the return of the electrical and chemiluminescent plant parameters to the starting values (before the action of lead ions) can indicate whether living cells are able to cope with detoxifying from heavy metals and whether they can survive when exposed to certain concentration of lead compounds. Algae of *Nitellopsis obtusa* in the first stage of exposure (5 hours) are able to accumulate organic compounds of lead without essential perturbations only up to specified concentrations (for example 1 mM of lead acetate). For higher lead content, an increase of ultraweak luminescence occurred which was probably associated with free radical productions and lipid peroxidation, as many researchers suggested.

Keywords: ultraweak luminescence, chemiluminescence, *Nitellopsis obtusa*, organic lead, membrane resistance, resting potential

WSTĘP

Szkodliwość metali ciężkich wprowadzanych przez człowieka do środowiska jest dziś faktem bezspornym i obszernie opracowanym w literaturze naukowej. Ze względu na naturalne zdolności roślin do akumulacji tych pierwiastków udaje się wykorzystywać organizmy roślinne do fitoremediacji gleb. Mimo zmniejszania się stopnia zanieczyszczenia środowiska w Polsce [Gruca-Królikowska & Waclawek 2006], wciąż w rolnictwie mamy do czynienia ze stosowaniem nawozów (tak mineralnych jak i organicznych) oraz środków ochrony roślin. Odpady ściekowe, przemysłowe itp. poprzez gleby i powietrze przedostają się także do akwenów wodnych z obszarów zlewni. W środowisku wodnym zanieczyszczenia te mają tendencję do gromadzenia się w makrofitach i osadach dennych jezior oraz w ujściach rzek [Pawłowski 2011]. Największe zagrożenie dla środowiska w Polsce pod względem ilości metali ciężkich emitowanych antropogenicznie stwarza energetyka, która korzysta z węgla kamiennego i brunatnego. Swój niemały wkład w zanieczyszczeniu wód powierzchniowych mają zanieczyszczenia pyłowe, których źródłem oprócz elektrowni są też zakłady przemysłowe. I tak na przykład ważnym źródłem uwalniania ołowiu do środowiska są zakłady produkujące baterie i akumulatory, powłoki kabli, emalie, polewy, farby, lakiery szkła, oraz kryształy. Z gleb i wód metale ciężkie

jak i inne cząsteczki toksyczne przedostają się do łańcucha pokarmowego: roślina-zwierzę-człowiek, mogąc akumulować się w każdym z tych organizmów do poziomu toksycznego. Aby chronić się przed toksycznym efektem zaabsorbowanych jonów metali ciężkich, organizmy roślinne uruchamiają różnorodne mechanizmy obronne w swoich komórkach. Należą do nich: adsorpcja na ściankach komórkowych, kompartmentacja w wakuolach, wzmocnienie aktywnego wydalania jonów lub indukcja zwiększonej ilości chelatorów metali, czyli związków białka typu metalotionein i fitochelatyn, a także różnych związków organicznych (cytrynianów) i nieorganicznych (siarczków) [Gupta i in. 2013a].

Obiektem przedstawionych w tej pracy badań są rośliny *Nitellopsis obtusa* (ramienice). Należą one do najwyższej uorganizowanych glonów. Występowanie łąk ramienicowych w akwenach wodnych wskazuje na właściwie natlenienie zarówno wód naddennych jak i powierzchniowej warstwy osadów. Uważa się nawet, że ramienice, a zwłaszcza gatunki duże (o średnicy niby-łodygi większej niż 1 mm), które występują głębiej, należą do roślin najwrażliwszych na proces eutrofizacji oraz innych przekształceń ekosystemów wodnych [Pełechaty & Pukacz 2008]. Wraz ze wzrostem żyzności, a tym samym mętności wody ramienice zanikają, stąd uznawane są powszechnie za bioindykatory wód czystych, od oligo- do słaboeutroficznych. Jednak są one

nie tylko symptomem dobrego stanu ekosystemu wodnego, ale mają swój udział we wzroście i utrzymaniu czystości wód. Zwiększają mianowicie sedymentację cząsteczek do osadu z toni wodnej i tworząc gęste łąki przeciwdziałają procesowi odwrotnemu, czyli unoszeniu się cząsteczek z osadu do toni. W ten sposób przyczyniają się do wzrostu przezroczystości wód.

Welsh i Denny [1980] stwierdzili dużą wrażliwość roślin *Nitellopsis obtusa* na absorpcję metali ciężkich, w tym ołowiu i miedzi, głównie poprzez wychwyt ich jonów ze środowiska wodnego przez tzw. niby-lodygi. Gomes i Aseada [2010] zwrócili szczególną uwagę na gatunki Charophyta, których ścianki są pokryte (inkrustowane) węglanem wapnia nazywając je wręcz hiperakumulatorami metali ciężkich z osadów dennych. Wpływ związków organicznych metali ciężkich na funkcjonowanie żywych struktur badali między innymi: Llamas i in. [2008], Sharma i Dubey [2005], Manusadzianas i in. [2002], Seregin i Ivanov [2001], Przestalski i in. [2000]. Zmiany w elektrycznych właściwościach komórek biologicznych eksponowanych na związki metali ciężkich były badane przez: Gramigini i in. [2009], Miśkiewicz i in. [2010], Kurtyka i in. [2011], Trela i in. [2012].

Gupta i in. [2013b] szeroko udokumentowali, że toksyczność ołowiu we wczesnej fazie jego pochłaniania przez rośliny polega na wygenerowaniu dużej ilości wolnych rodników, co prowadzi do tak zwanego stresu oksydacyjnego w komórkach roślinnych. Z kolei wiadomo, że pewna część wolnych rodników oraz produktów reakcji związanych ze stresem występuje w stanach wzbudzonych i dezaktywacja tych stanów prowadzi do emisji kwantów promieniowania elektromagnetycznego. Ma to swoje odzwierciedlenie w zmianach intensywności ultrałabej luminescencji (UWL – ultraweak luminescence). Jest to promieniowanie z zakresu od bliskiego ultrafioletu, poprzez część widzialną widma, do bliskiej podczerwieni (300–1300 nm), o bardzo małym natężeniu, rejestrowane tylko przez niezwykle czułe detektory. Natężenie takiej emisji fotonowej leży daleko poniżej energetycznego progu czułości ludzkiego oka [Cifra & Pospíšil 2014].

Marchlewicz i in. [2004] wykryli, że wynikiem stresu oksydacyjnego powstałego na skutek ekspozycji żywych komórek na działanie organicznych związków ołowiu jest peroksydacja lipidów (łańcuchowy proces wolnorodnikowy). Co więcej, znaleźli oni korelację pomiędzy poziomami natężenia UWL a stężeniami związków ołowiu.

W pracy podjęto próbę zastosowania dwóch różnych biofizycznych metod: elektrycznej oraz chemiluminescencyjnej celem sprawdzenia czy okażą się one dostatecznie czułe na wykrywanie pochłaniania jonów ołowiu przez makroalgi *Nitellopsis obtusa* w krótkim czasie po ekspozycji roślin na działanie tych jonów. Obie techniki pomiarowe są nieinwazyjne, dzięki czemu można je stosować *in vivo*. Badano, czy rejestracja natężenia UWL w pierwszym etapie wchłaniania jonów ołowiu przez rośliny (do pięciu godzin) wykaże zauważalne zmiany w intensywności świecenia, a jeśli tak, to dla jakich stężeń i po jakim czasie od podania reagenta. Interesującym było również monitorowanie parametrów elektrycznych błony komórkowej tych roślin po podaniu związków ołowiu. Do badań wybrano dwa związki rozpuszczalne w wodzie: 1) octan ołowiu zawierający ołów na drugim stopniu utlenienia i działający bardzo toksycznie na organizmy wodne, 2) chlorotrimetylołów, słabiej rozpuszczalny w wodzie, będący bardzo silnym utleniaczem (czwarty stopień utlenienia ołowiu).

W świetle przedstawionych danych literaturowych zmiany w poziomie natężenia ultrasłabej luminescencji powinny wykazać po jakim czasie od podania związków ołowiu następuje reakcja roślin na zadany reagent oraz jak jest ona silna i na ile specyficzna przy różnych związkach ołowiu. Pomiar parametrów elektrycznych komórek powinny pomóc w ustaleniu na ile związki ołowiu oddziałują na błony komórkowe roślin.

MATERIAŁY I METODY

Materiał badany

Badania przeprowadzono w warunkach *in vivo* na komórkach glonów gatunku *Nitellopsis obtusa* (Desv. in Lois.) J.Gr. z rodziny Characeae (gromada Charophyta). Rośliny pobierane były z jeziora Zagłębcze (51°25'N, 23°01'E) należącego do pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego znajdującego się w rejonie Lubelskiego Zagłębia Węglowego w Polsce. Glony w laboratorium hodowane były przy naturalnym oświetleniu (dzień – noc) w temperaturze 18–20 °C. Skład wody jeziorowej w akwarium, w którym przetrzymywane były rośliny wynosił (mM/dm³): Na⁺ – 0.23, K⁺ – 0.7, Cl⁻ – 0.19, Ca⁺² – 0.82, Mg⁺² – 0.01, pH = 7.8.

W celu wykonania pomiarów luminescencyjnych rośliny wkładano do płaskich cylindrycznych naczynek przeznaczonych do umieszczenia w światłoszczelnej komorze aparatury pomiarowej. Próbką zawierała pojedyncze rośliny w ilości ok. 30 komórek międzywęzłowych. Naczynia z komórkami zalewano roztworem APW (artificial pond water) w ilości 18 ml, którego skład wynosił: 0,1 mM KCL, 0,1 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, buforowanym 20 mM Hepesem. Wartość pH roztworu ustalano na poziomie 7,4 – 7,5 za pomocą 10% NaOH. APW tworzone na bazie wody redestylowanej. Dodatkowo przed rozpoczęciem pomiarów rośliny przetrzymywano przez jedną godzinę w roztworze z antybiotykami: 10 µg/cm³ streptomycyny i 20 µg/cm³ penicyliny G [Gędziorowska 1983] w celu uniknięcia rejestracji luminescencji z bakterii znajdujących się na ściankach roślin.

Przed pomiarami elektrycznymi rośliny przepłukiwano pod bieżącą wodą, a następnie kondycjonowano przetrzymując przez kilka godzin w APW.

Do badań użyto dwóch rozpuszczalnych w wodzie związków ołowiu: octan ołowiu Pb(CH₃COO)₂ w zakresie stężeń 6·10⁻⁶ M – 10⁻³ M oraz chlorotrimetylołów (CH₃)₃PbCl w zakresie stężeń 0,1·10⁻³ M – 25·10⁻³ M.

Pomiary chemiluminescencyjne

Metoda zastosowana w badaniach chemiluminescencyjnych polegała na pomiarach ultrasłabej luminescencji (UWL) o intensywności 10–10⁴ fotonów·s⁻¹·cm⁻² z wykorzystaniem techniki Single Photon Counting (SPC) w zakresie spektralnym 340–700 nm. Jako detektor fotonów zastosowano czuły i niskoszumowy fotonowielacz THORN EMI-9598A chłodzony do temperatury 265 K. Opis aparatury przedstawiono w pracy Jaśkowska i in. [2001].

Przed pomiarami próbki z roślinami były przetrzymywane kilkanaście godzin w światłoszczelnej komorze aparatury pomiarowej w celu wyświecenia długotrwałej luminescencji indukowanej światłem. Taki zabieg umożliwiał pomiar spontanicznej ultrasłabej emisji fotonowej generowanej przez stany wzbudzone cząsteczek będących produktami reakcji chemicznych pochodzących z wnętrza komórek.

Czas zliczeń impulsów wynosił 1 minutę, zarówno dla próbek roślin z reagentem jak i dla mierzonych równolegle próbek kontrol-

nych roślin w APW. Po kilkudziesięciu minutach od rozpoczęcia pomiarów UWL z komórek umieszczonych w 18 ml APW, do naczynia z badanymi roślinami dodawano 2 ml roztworu związku o takim stężeniu aby osiągnąć żądane końcowe stężenia biocynnika. Do próbki kontrolnej roślin dodawano 2 ml czystego APW. Pomiary trwały około 5 godzin.

Przed rozpoczęciem właściwych pomiarów z roślinami, przeprowadzono serie pomiarów testowych bez roślin, mających na celu określenie ewentualnego wpływu stosowanych reagentów dodawanych do APW, na mierzone tło UWL. Pomiary te nie wykazały istotnych zmian tła UWL po dodaniu związków ołowiu do APW.

Średnie tło ultrasłabej luminescencji dla APW wynosiło 800–1000 imp/min, zaś względna niepewność standardowa dla tych pomiarów nie przekraczała 1%. Quasistacjonarne natężenie UWL roślin przed podaniem reagenta było około 2-krotnie wyższe od tła i uzyskiwana względna niepewność standardowa pomiaru nie przekraczała 2.5%.

Pomiary elektryczne

Pomiary rezystancji elektrycznej błon komórkowych pojedynczych komórek *Nitellopsis obtusa* przeprowadzono przy użyciu zmiennoprądowego mostka RC za pomocą 4 elektrod zewnętrznych stosując prąd 2 µA/cm² o stałej częstotliwości 70 Hz. Testy na kontrolnych roślinach wykazały, że taki prąd nie powoduje obserwowalnych zmian w strukturze i funkcjonowaniu komórek.

W eksperymencie konieczne było zastosowanie komórek roślinnych o długości około 10 cm, czyli dłuższych niż te stosowane w pomiarach chemiluminescencyjnych. Było to podyktowane metodyką eksperymentu, która zakładała pomiary przeprowadzane dla kilku różnych położenia naczynka pomiarowego przesuwanego wzdłuż komórki. Detale układu mostkowego, zasadność stosowania powyżej podanych parametrów prądu oraz sposób określenia wartości oporów błony i wnętrza komórki z zastosowaniem rozsuwanych naczynek podane są w pracy Żoźnierczuka [1971].

Drugim mierzonym parametrem elektrycznym błony komórkowej jest potencjał spoczynkowy, który definiowany jest jako ustabilizowana różnica potencjałów między otoczeniem i wnętrzem komórki. Parametr ten mierzy się przy pomocy mikroelektrody wprowadzanej do

komórki i elektrody odniesienia umieszczonej w roztworze stanowiącym otoczenie komórki. W naszych badaniach używaliśmy mikroelektrody ze szkła pyreksowego wypełnionej roztworem KCl – 3 mol/dm³ oraz elektrody odniesienia wykonanej ze srebra i powlekaną galwanicznie powłoką chlorku srebra. Mikroelektrodę o średnicy końca 2 mikrometry umieszczano precyzyjnie w komórce za pomocą specjalnego mikromanipulatora pod mikroskopem świetlnym. Przed umieszczeniem mikroelektrody w komórce, napięcie między mikroelektrodą a elektrodą odniesienia było kompensowane do zera. Do pomiarów wybierane były nieco większe komórki co zapewniało większą precyzję wprowadzania mikroelektrody oraz szybszą stabilizację parametrów elektrycznych po nakłuciu.

WYNIKI

Pomiary chemiluminescencyjne

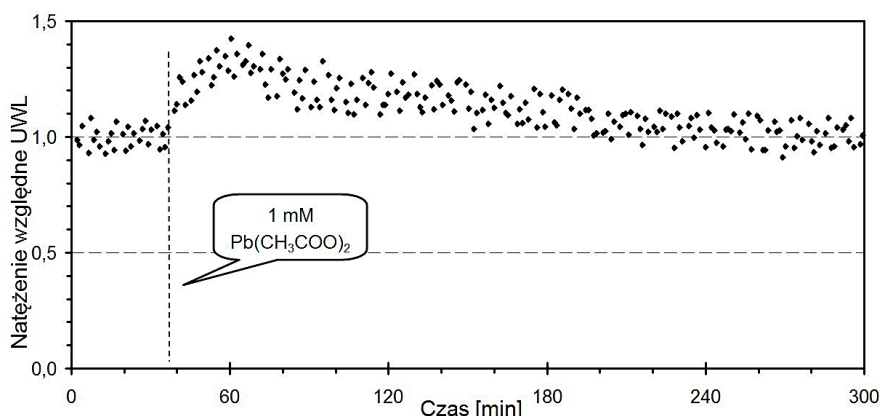
Pomiary ultrasłabej luminescencji przeprowadzono dla roślin *Nitellopsis obtusa* poddanych działaniu obu organicznych związków ołowiu o stężeniu z zakresu 6 μM – 100 μM. Nie stwierdzono jednak zauważalnych zmian natężenia UWL w czasie trwania eksperymentu, tj. przez okres pięciu godzin. Dopiero wyższe koncentracje bioczynników – 1 mM lub 10 mM octanu ołowiu oraz 10 mM i 25 mM chlorotrimetylołowiu – spowodowały oczekiwane reakcje w posta-

ci wzrostu natężenia ultrasłabej luminescencji. Kinetykę zmian natężenia UWL w funkcji czasu po ekspozycji komórek roślinnych na działanie octanu ołowiu o stężeniu odpowiednio 1 mM i 10 mM przedstawiono na rysunkach 1 i 2.

Wyniki pomiarów są prezentowane jako natężenie względne UWL, co oznacza, że od zarejestrowanego natężenia UWL roślin odejmowano najpierw natężenie UWL tła rejestrowanego równolegle. Następnie obliczano stosunek natężenia UWL próbki (I) do średniej wartości natężenia UWL sprzed podania reagenta (I₀), przez co otrzymywano natężenie względne UWL roślin (I/I₀).

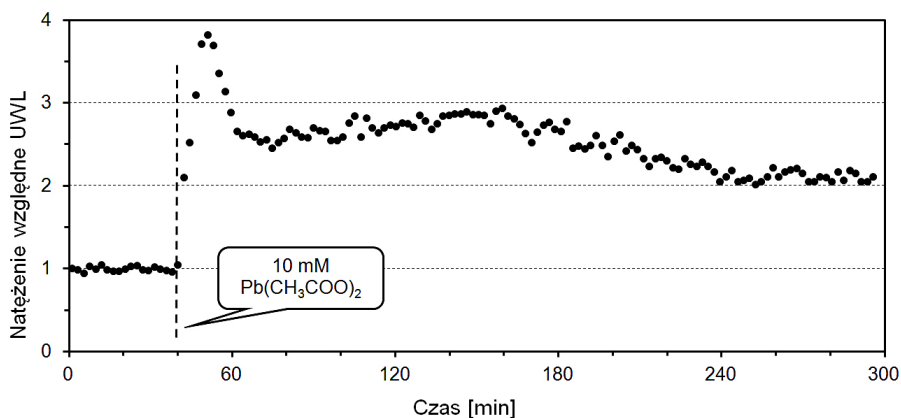
W obu przypadkach (rys. 1 i 2) reakcja roślin była natychmiastowa – następował wzrost intensywności emisji ultrasłabego promieniowania, a maksimum natężenia występowało po 12 – 22 minutach od momentu ekspozycji roślin na ołów. Maksymalne natężenie emisji dla 10 mM octanu ołowiu było 3,8 razy większe od poziomu natężenia emisji spontanicznej nietkniętych komórek, a dla 1 mM – tylko 1,4 razy większe. Warto podkreślić, że przy 1 mM stężeniu jonów ołowiu po upływie około 4 godzin poziom emisji promieniowania powrócił do początkowej wartości.

Kinetyka wyświecania stanów wzbudzonych atomów i cząsteczek dla 10 mM roztworu octanu ołowiu była odmienna. Po początkowym gwałtownym wzroście i spadku (20 min), przez następne półtorej godziny obserwuje się lekki wzrost poziomu świecenia (I/I₀ = 2.8). Jednak w dalszej fazie eksperymentu (kolejne 2 godziny) emisja fotonów zmniejszyła się i na koniec przekracza-



Rys. 1. Względne natężenie ultrasłabej luminescencji (UWL) dla reprezentatywnej próbki roślin *Nitellopsis obtusa* po ekspozycji na działanie 1 mM octanu ołowiu – zliczenia 1 minutowe. Względna niepewność standardowa po dodaniu reagenta nie przekraczała 10 %

Fig. 1. Relative intensity of ultraweak luminescence (UWL) of the *Nitellopsis obtusa* representative sample exposed to the action of 1 mM lead acetate (one minute counts). Relative standard uncertainty after the addition of reagent is not more than 10 %



Rys. 2. Względne natężenie ultrasłabej luminescencji (UWL) reprezentatywnej próbki roślin *Nitellopsis obtusa* po ekspozycji na działanie 10 mM octanu ołowiu. Każdy punkt reprezentuje średnią z 3 jednonominutowych pomiarów. Względne niepewności standardowe w pobliżu maksimum oraz na koniec pomiaru nie przekraczają odpowiednio 10 % i 5 %

Fig. 2. Relative intensity of UWL of the *Nitellopsis obtusa* representative sample exposed to the action of 10 mM lead acetate. Each point represents mean value of three one minute measurements. Relative standard uncertainties near maximum and at the end of the measurement are not more than 10 % and 5 % respectively

ła początkową wartość tylko dwukrotnie. Wyniki pokazane na rysunkach 1 i 2 są odpowiedzią chemiluminescencyjną reprezentatywnych pojedynczych próbek zawierających każda po 30 komórek. Aby nie zacierać charakteru przebiegu zmian w intensywności UWL, nie uśredniano rezultatów dla wielu próbek. Z przebadanych 12-tu próbek, podobny charakter zmian w odpowiedziach na Pb w stężeniu 10 mM wykazywało 8 próbek. Cztery miały przebiegi zbliżone, ale o mniejszych wartościach maksymalnych natężeń UWL.

Badania wpływu innego związku ołowiu – chlorotrimetyloolowiu – na odpowiedzi chemiluminescencyjne roślin *Nitellopsis obtusa* rozpoczęto od roztworu o stężeniu 1 mM. Nie zaobserwowano jednak znaczących zmian w emisji fotonowej roślin w okresie 5 godzin po podaniu reagenta. Natomiast dla stężenia 10 mM w tym samym czasie stwierdzono 10-krotny wzrost I/I_0 bez pojawienia się tendencji spadkowej w emisji fotonów (rys. 3). Użyto zatem roztworu o większym stężeniu Pb, tj. 25 mM. W tym przypadku po 4.5 godzinach eksperymentu zaobserwowano maksimum emisji ($I/I_0 = 60$), po którym pojawił się jej spadek.

Warto zauważyć, że po dodaniu chlorotrimetyloolowiu o stężeniu 10 mM rośliny przez okres około 50 minut nie reagowały wzrostem ultrasłabej emisji, w przeciwieństwie do reakcji natychmiastowej przy tym samym stężeniu 10 mM dla octanu ołowiu. Natomiast dla stężenia 25 mM chlorotrimetyloolowiu widoczny jest (w powiększonym fragmencie na rys. 3), natychmiastowy

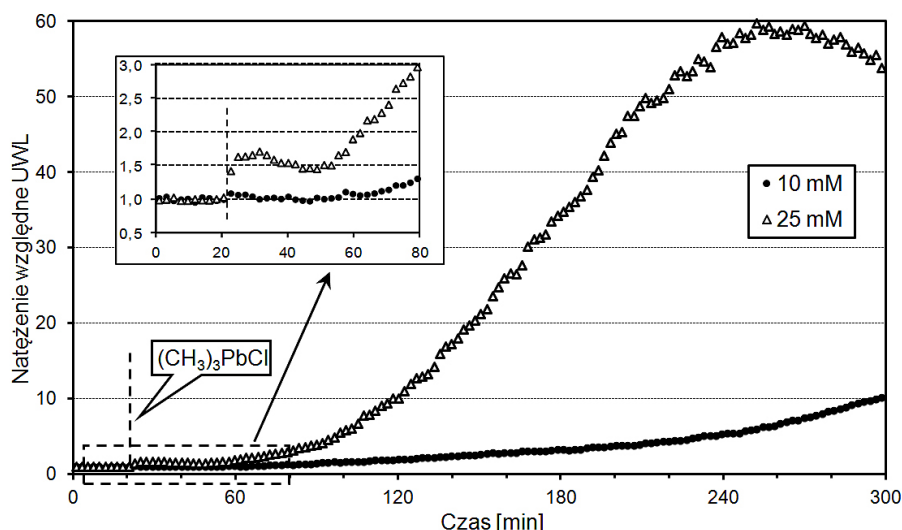
wzrost emisji fotonowej osiągający w pierwszej fazie poziom ok. 1,6 krotności natężenia sprzed podania reagenta.

Pomiary elektryczne

Rezultaty pomiarów parametrów elektrycznych błon komórek *Nitellopsis obtusa* ekspozowanych na działanie octanu ołowiu o stężeniach 6, 12, 25, 50 i 100 μM przedstawiono na rysunkach 4 i 5.

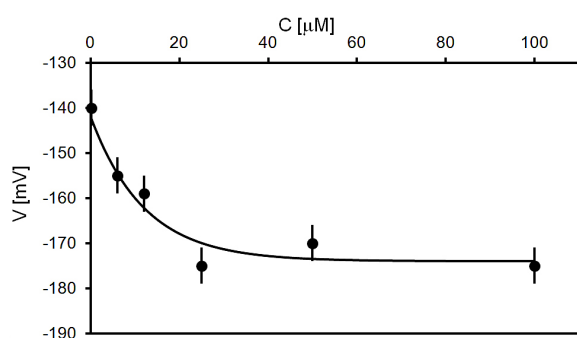
Potencjał spoczynkowy błon mierzono wykonując po 6 serii pomiarowych dla każdego stężenia reagenta. Jak widać (rys. 4) wartość bezwzględna potencjału spoczynkowego równa początkowo 140 mV wzrasta wraz ze wzrostem koncentracji jonów Pb w roztworze. Dla dużych stężeń ołowiu wzrost ten wynosi około 25 % dając wartość potencjału 175 mV.

Zbadano również względne zmiany oporu elektrycznego błony komórkowej roślin w funkcji czasu dla różnych stężeń octanu ołowiu, co ilustruje rysunek 5. Pomiary przeprowadzono dla czterech stężeń z przedziału 6 – 50 μM wykonując po 12 serii pomiarowych dla każdego stężenia. Wartość oporu elektrycznego błon przed dozowaniem reagenta mieściła się w granicach 8 – 25 $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$. Ze względu na jego różniące się wartości dla poszczególnych komórek, należało zmiany oporu odnieść do jego wartości początkowych. Dlatego na rysunku 5 przedstawiono względne wartości oporu, tj. stosunek oporu błony po ekspozycji na działanie reagenta (R) do oporu błony



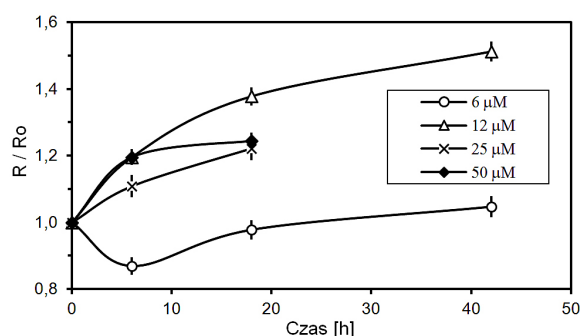
Rys 3. Względne natężenie ultrasłabej luminescencji (UWL) reprezentatywnych próbek roślin *Nitellopsis obtusa* po ekspozycji na działanie 10 i 25 mM chlorotrimeryloołowiu. Każdy punkt reprezentuje średnią z 3 jednoczyniowych pomiarów. Względna niepewność standardowa po dodaniu reagenta nie przekraczała 10%

Fig. 3. Relative intensity of UWL of the *Nitellopsis obtusa* representative sample exposed to the action of 10 and 25 mM trimethyl-lead chloride. (Each point represents mean value of three one minute measurements). Relative standard uncertainty after the addition of reagent is not more than 10%



Rys. 4. Zależność potencjału spoczynkowego (V) komórek *Nitellopsis obtusa* od stężenia (C) octanu ołowiu. Każdy punkt odpowiada średniej wartości z 6 pomiarów. Zaznaczono niepewności standardowe pomiarów

Fig. 4. Correlation of resting potential (V) of *Nitellopsis obtusa* cells versus concentrations (C) of lead acetate. Each point is average value of 6 cells measurements. The standard uncertainty for each point is plotted



Rys. 5. Zależność względnego oporu błonowego komórek *Nitellopsis obtusa* od czasu dla różnych stężeń octanu ołowiu. Każdy punkt stanowi średnią z 12 pomiarów. Zaznaczono niepewności standardowe pomiarów

Fig. 5. Changes of relative cell membrane resistance of *Nitellopsis obtusa* cells as a function of time for different concentrations of lead acetate. Each point is average value of 12 cells measurements. The standard uncertainty for each point is plotted

komórki przed ekspozycją (R_0). Sześć godzin po zastosowaniu reagenta opór elektryczny błon dla roztworu o najniższym stężeniu wyjątkowo zmalał o 13%, podczas gdy dla pozostałych koncentracji wzrósł o 11 – 20%. Przy dłuższych czasach ekspozycji i wyższych stężeniach ołowiu (25 μM i 50 μM) na rysunku 5 nie zaznaczono punktów, ponieważ komórki nie przeżywały 42 godzin ekspozycji na działanie reagenta.

DYSKUSJA I WNIOSKI

We wczesnym stadium absorpcji ołowiu przez makrofity *Nitellopsis obtusa*, tzn. w okresie 5-ciu godzin od podania reagentów nie wykryto zmian w natężeniu emisji ultrasłabego promieniowania dla niższych koncentracji organicznych związków ołowiu, tj. w zakresie stężenia od 6 μM do 0,1 mM octanu ołowiu oraz od 6 μM do 5 mM

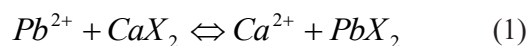
dla chlorotrimetylołowiu. Dopiero po podaniu większych dawek do roślin, tj. od 1 mM do 10 mM octanu ołowiu oraz od 10 mM do 25 mM dla chlorotrimetylołowiu, zaobserwowano zmiany w intensywności ultrasłabego świecenia (rys. 1, 2 i 3). W czasie 5-cio godzinnego czasu trwania eksperymentu po zadaniu 1 mM octanu ołowiu do próbek z roślinami, wzrost natężenia UWL był niewielki oraz przemijający – wartość natężenia stopniowo wracała do początkowego poziomu świecenia roślin (rys. 1).

W celu sprawdzenia, czy penetracja ołowiu do komórek *Nitellopsis obtusa* po zadaniu małych stężeń octanu ołowiu (poniżej 1 mM) jest w stanie wywołać peroksydację lipidów błony, użyto metod elektrofizjologicznych. Za ich pomocą badano parametry elektryczne komórek tj. opór elektryczny błony komórkowej oraz jej potencjał spoczynkowy. Richter [1978] stwierdził, że jeśli ma miejsce peroksydacja lipidów błony komórkowej, jej opór elektryczny maleje. Rysunek 5 wskazuje, że przy stężeniach od 12 do 50 μM octanu ołowiu następuje wzrost względnego oporu elektrycznego błony komórkowej badanych roślin. Wyniki te sugerują, że może rzeczywiście dla stężeń mniejszych od 1 mM octanu ołowiu nie następuje peroksydacja lipidów w błonie, co potwierdzałyby uzyskany wynik braku zmian intensywności UWL. Potwierdzają to również wyniki pomiarów potencjału spoczynkowego błony dla stężeń octanu ołowiu poniżej 1 mM (rys. 4). Po zadaniu tego reagenta następowała hiperpolaryzacja błony komórkowej zamiast spodziewanej depolaryzacji, która jak wiadomo towarzyszy zjawisku peroksydacji lipidów.

Pokazane na rysunku 5 obniżenie wartości oporu elektrycznego błony komórkowej po podaniu 6 μM octanu ołowiu jest trudne do wytłumaczenia. Zrozumienie tego zjawiska wymaga dalszych badań. Dla stężeń wyższych niż 50 μM w badaniach przy użyciu mostka zmiennoprądowego następowało zmniejszenie turgoru komórek co uniemożliwiało przesuwanie naczynka wzdłuż komórki i tym samym pomiar oporu stawał się niemożliwy do przeprowadzenia.

Zmiany w natężeniu UWL, jak podają Turrens [1988], Sławiński i in. [1998], Pospíšil i in. [2014] są odzwierciedleniem wzrostu wolnych rodników, peroksydacji lipidów i stresu oksydacyjnego w żywych organizmach. Peroksydacja lipidów może być wywołana związkami metali ciężkich, m. in. ołowiu [Gupta i in. 2013a, Pinto i in. 2003, Shadid i in. 2014].

Wydaje się oczywiste, że w pierwszej fazie absorpcji ołowiu przez glony *Nitellopsis obtusa* jony ołowiu są magazynowane w ściankach komórkowych roślin. Główny mechanizm sorpcji kationów metali ciężkich ogólnie przez biomasę glonów to wymiana jonowa pomiędzy roztworem a plechą [Ahmady-Asbchin i in. 2008, Gokhale i in. 2008, Kłós & Rajfur 2013]. Na bazie przeprowadzonych badań przez Davisa [Davis i in. 2003] wykryto, że ścianki komórek glonów są zbudowane nie tylko ze składników organicznych, ale zawierają także np. jony Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} . Podczas sorpcji jonów Pb^{2+} przez glony, w roztworze, w którym były zanurzone, stwierdzono wzrost zanieczyszczenia wapniem. Proces wymiany metali ciężkich z jonami wapnia (CaX_2) może być opisany za pomocą stechiometrycznego równania (Matos i in. 2009):



Dla wyższych koncentracji octanu ołowiu (większych niż 1 mM) może pojawić się proces saturacji ołowiu w ściankach komórkowych. Wtedy jony ołowiu zaczną być transportowane przez błonę do komórki powodując peroksydację lipidów błony, której towarzyszy wzrost natężenia UWL w pierwszych 20 minutach ekspozycji (rys. 1 i 2).

O ile stężenie 1 mM octanu ołowiu nie stanowiło jeszcze dużego zagrożenia dla roślin (poziom świecenia komórek powracał do wartości początkowej), o tyle zarówno 10 mM tego związku oraz 10 mM i 25 mM chlorotrimetylołowiu powodowało nieodwracalne zmiany w funkcjonowaniu komórek (zatrzymanie ruchu cytoplazmy a w dalszej kolejności śmierć komórek). Badania Sousa & Soares [2014] oraz Wu i in. [2008] pokazały, że organiczne pochodne ołowiu zatrzymują fosforylację oksydacyjną zachodzącą w mitochondriach oraz blokują aktywność fotosyntezy u roślin. W obu przypadkach może to prowadzić do upośledzenia w funkcjonowaniu komórek a nawet do ich śmierci.

O zmianach w przepuszczalności jonów na błonie mogą świadczyć zmiany w wartościach oporu elektrycznego i potencjału spoczynkowego błony po dodaniu octanu ołowiu. Uzyskany wzrost wartości oporu świadczy o obniżeniu przewodnictwa błonowego dla trzech podstawowych jonów: K^+ , Na^+ i Cl^- . Może się to wiązać z wymianą, wspomnianą wyżej, jonów Ca^{2+} na jony Pb^{2+} w ściance komórkowej. Jony ołowiu powodują obniżenie aktywności enzymatycznej

blonowej pompy sodowo-potasowej odpowiedzialnej za transport jonów K^+ i Na^+ [Gramigni i in. 2009, Kurtyka i in. 2011].

Drugi związek ołowiu (chlorotrimetylołów) dysocjuje najprawdopodobniej na jony: Cl^- i $(CH_3)_3Pb^+$. Jon organiczny ołowiu atakuje błonę o wiele wolniej (na rysunku 3 widoczne opóźnienie wzrostu luminescencji), lecz skutki jego działania w czasie 5-ciu godzin od zadania reagenta są bardzo duże. Poziom świecenia przy stężeniu 25 mM wzrasta sześćdziesięciokrotnie, co wskazuje na nekrotyczne procesy mające miejsce w roślinach po zadaniu tego reagenta.

Konkludując należy odnotować, że obserwacja zmian zarówno parametrów elektrycznych jak i luminescencyjnych, komórek roślin *Nitellopsis obtusa* po ich ekspozycji na działanie użytych związków ołowiu jest możliwa, ale w różnych zakresach stężeń: dla małych koncentracji odpowiednie są metody elektryczne natomiast dla dużych stężeń (toksycznych) – metoda luminescencyjna. Ważne, że obie metody mogą być użyte i „wyczuwają” zmiany określonych parametrów w pierwszej fazie ekspozycji organizmów roślinnych na działanie zanieczyszczeń; w tym wypadku organicznych związków ołowiu.

Warto rozszerzyć badania na dłuższy okres obserwacji (powyżej 5 godzin) oraz znaleźć najmniejsze stężenia krytyczne, po przekroczeniu których następują zmiany nieodwracalne w żywych komórkach. Cenne byłoby także wzbogacenie badań poprzez włączenie metod biochemicznych. Warto byłoby również sprawdzić pochłanianie tych związków przez glony po uprzednim poddaniu ich antyoksydantom, takim jak np. kwas askorbinowy, β -karoten i α -tokoferol.

LITERATURA

- Ahmady-Asbchin, S., Andres, Y., Gerente, C., Le Cloiree, P. 2008. Biosorption of Cu(II) from aqueous solution by *Fucus serratus*: surface characterization and sorption mechanisms. *Bioresource Technol.*, 99, 6150–6155.
- Cifra, M. & Pospíšil, P. 2014. Ultra-weak photon emission from biological samples: definition, mechanisms, properties, detection and applications. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 139, 2–10.
- Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A.A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.*, 37, 4311–4330.
- Gędziorowska, D. 1983. Izolacja bałtyckich glonów jednokomórkowych i uzyskanie kultur aksenicznych dla badań fizjologiczno-biochemicznych. *Studia i Materiały Oceanologiczne PAN*, 41, 222–226.
- Gokhale, S.V., Jyoti, K.K., Lele, S.S. 2008. Kinetic and equilibrium modeling of chromium (VI) biosorption on fresh and spent *Spirulina platensis* / *Chlorella vulgaris* biomass. *Bioresource Technol.*, 99, 3600–3608.
- Gomes, P.I.A. & Aseada, T. 2010. Charophytes as a hyperaccumulator of heavy metals: role of calcification and applicability in restoration of polluted water bodies. *Rep. Res. Edu. Ctr. Inlandwat. Environ.*, 6, 73–81.
- Gramigni, E., Tadini-Buoninsegni, F., Bartolomei, G., Santini, G., Chelazzi, G., Moncelli, M.R. 2009. Inhibitory Effect of Pb^{2+} on the Transport Cycle of the Na^+, K^+ -ATPase. *Chem. Res. Toxicol.*, 22(10), 1699–1704.
- Gruca-Królikowska, S. & Waclawek, W. 2006. Metale w środowisku, Część II Wpływ metali ciężkich na rośliny. *Chemia, Dydaktyka, Ekologia, Metrologia*, 11(1–2), 41–55.
- Gupta, D.K., Corpas, F.J., Palma, J.M. 2013b. Lead and oxidative stress (In: Heavy metal stress in plant, Eds: D.K. Gupta, F.J. Corpas, J.M. Palma) – Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 121–148.
- Gupta, D.K., Huang, H.G., Corpas, F.J. 2013a. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20, 2150–2161.
- Jaśkowska, A., Borc, R., Dudziak, A., Milczarek, I., Śpiewła, E. 2001. Kinetics studies of ultraweak luminescence induced by ascorbic acid in Characeae cells and their structures. *Luminescence*, 16, 51–56.
- Kłós, A. & Rajfur, M. 2013. Influence of hydrogen cations on kinetics and equilibria of heavy metal sorption by algae – sorption of copper cations by the alga *Palmaria palmata* (Linnaeus) Weber & Mohr (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 25, 1387–1394.
- Kurtyka, R., Burdach, Z., Karcz, W. 2011. Effect of cadmium and lead on the membrane potential and photoelectric reaction of *Nitellopsis obtusa* cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, 30, 52–58.
- Llamas, A., Ullrich, C.I., Sanz, A. 2008. Ni^{2+} toxicity in rice: effect on membrane functionality and plant water content. *Plant Physiol. Biochem.*, 46(10), 905–910.
- Manusadzianas, L., Maksimov, G., Darginaviciene, J., Jurkoniene, S., Sadauskas, K., Vitkus, R. 2002. Response of the charophyte *Nitellopsis obtusa* to heavy metals at the cellular, cell membrane, and enzyme levels. *Environ. Toxicol.*, 17(3), 275–283.

16. Marchlewicz, M., Michalska, T., Wiszniewska, B. 2004. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere*, 57(10), 1553–1562.
17. Matos, M.G.N., Diniz, V.G., Abreu, C.A.M., Knoechelmann, A., Silva, V.L. 2009. Bioadsorption and ion exchange of Cr^{3+} and Pb^{2+} solution with algae. *Adsorption*, 15, 75–80.
18. Miśkiewicz, J., Trela, Z., Przystalski, S., Karcz, W. 2010. Superstatistics analysis of the ion current distribution function: Met_3PbCl influence study. *Eur. Biophys. J.*, 39, 1397–1406.
19. Pawłowski, L. 2011. Sustainability and Global Role of Heavy Metals. *Problems of Sustainable Development*, 6, 59–64.
20. Pełchaty, M. & Pukacz, A. 2008. Klucz do oznaczania gatunków ramienic (Characeae) w rzekach i jeziorach. Biblioteka Monitoringu Środowiska. Warszawa, 1–80.
21. Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.*, 39(6), 1008–1018.
22. Pospíšil, P., Prasad, A., Rac, M. 2014. Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 139, 11–23.
23. Przystalski, S., Sarapuk, J., Kleszczyńska, H., Gabrielska, J., Hładyszowski, J., Trela, Z., Kuczera, J. 2000. Influence of amphiphilic compounds on membranes. *Acta Biochim. Polon.*, 47, 627–638.
24. Richter, Ch. 1987. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. And Phys. of lipids*, 44(2–4), 175–189.
25. Seregin, I.V. & Ivanov, V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, 48(4), 523–544.
26. Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E. 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 232, 1–4.
27. Sharma, P. & Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1), 35–52.
28. Sławiński, J., Godlewski, M., Gumińska, M., Kędryna, T., Kwiecińska, T., Laszczka, A., Szczęśniak-Fabiańczyk, B., Wierzuchowska, D. 1998. Stress-induced peroxidation and ultraweak photon emission of spermatozoa cells. *Curr. Top. Biophys.*, 22(sup.B), 195–203.
29. Sousa, C.A. & Soares, E.V. 2014. Mitochondria are the main source and one of the targets of Pb (lead)-induced oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(11), 5153–5160.
30. Trela, Z., Burdach, Z., Przystalski, S., Karcz, W. 2012. Effect of trimethyllead chloride on slowly activating (SV) channels in red beet (*Beta vulgaris* L.) taproots. *C R Biol.*, 335(12), 722–730.
31. Turrens, J.F. 1988. Low level chemiluminescence: a non invasive assay for determining lipid peroxidation. (In: *Oxy-Radicals in molecular biology and pathology*, Eds: Cerutti P.A., Fridovich I., McCord J.M) New York, 82, 473–477.
32. Welsh, R.P.H. & Denny, P. 1980. The uptake of lead and copper by submerged aquatic macrophytes in two English lakes. *J. Ecol.*, 68(2), 443–445.
33. Wu, X., Hong, F., Liu, Ch., Su, M., Zheng, L., Gao, F., Yang, F. 2008. Effects of Pb^{2+} on energy distribution and photochemical activity of spinach chloroplast. *Spectrochim. Acta Part A*, 69(3), 738–742.
34. Żołnierczuk, R. 1971. Pomiar impedancji komórek *Nitellopsis obtusa* metodą elektrod zewnętrznych. *Folia Soc. Sci. Lublinensis*, C, 11, 53–71.