



Zdolność *Phalaris arundinacea* L. do fitoremediacji

Honorata Majorowicz¹, Henryk Urbanek¹, Marzena Wielanek¹, Maciej Zalewski²

¹Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Łódź

²Katedra Ekologii Stosowanej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Potential of *Phalaris arundinacea* L. for phytoremediation

Summary

The influence of a xenobiotic, a substrate and elicitors on glutathione S-transferase, peroxidase activities and glutathione concentration was studied in reed cannarygrass. The induction of both enzymes' activities and glutathione concentrations by 4-chlorophenol (xenobiotic), benzyl isothiocyanate (substrate), salicylic acid and 3-aminobutyric acid (elicitors) was shown. Salicylic acid treatment increased glutathione level, but did not decrease GSH/GSSG ratio. The ability of reed cannarygrass to adsorb 4-chlorophenol in the hydroponic culture was demonstrated. The obtained results suggest that the reed cannarygrass has significant potential to conjugate xenobiotics with glutathione and it may be useful for phytoremediation.

Key words:

plants, glutathione S-transferase, phytoremediation.

1. Wstęp

Zdolność roślin do pobierania organicznych ksenobiotyków z gleby, wody i powietrza wykazano w licznych publikacjach (1-3). Pobrane ze środowiska toksyczne substancje są w roślinach wiązane ze ścianami komórkowymi lub tworzą koniugaty z glutationem bądź z cukrami (4). Powstałe koniugaty, zwykle mniej toksyczne i łatwiej rozpuszczalne niż wyjściowe ksenobiotyki, są transportowane do wakuol i w nich akumulowane (5). Koniugacja z glutationem, katalizowana przez S-transferazę glu-

Adres do korespondencji

Henryk Urbanek,
Katedra Fizjologii
i Biochemii Roślin,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16,
90-237 Łódź.

biotechnologia

4 (63) 160-166 2003

tationową (GST, EC 2.5.1.18) stwarza możliwość usuwania szerokiego spektrum ksenobiotyków z zanieczyszczonego środowiska. Zdolność roślin do adsorbpcji i detoksykacji ksenobiotyków jest często związana ze zwiększoną zawartością glutationu i wyższą aktywnością GST (6,7). Spośród innych enzymów mogących uczestniczyć w detoksykacji ksenobiotyków zwracają uwagę peroksydazy (PO, EC 1.11.1.7). Mogą one utleniać fenole do form rodnikowych (8), które następnie polimeryzują tworząc kompleksy mało lub nietoksyczne. Glutation obok udziału w tworzeniu koniugatów pełni podstawową funkcję w przeciwdziałaniu oksydacyjnym stresom (9). Efektywność jego działania jako antyoksydanta zależy od wysokiego stosunku stężenia formy zredukowanej (GSH) do formy utlenionej (GSSG).

Duże zainteresowanie wzbudzają ostatnio związki indukujące reakcje obronne przeciw biotycznym i abiotycznym stresom. Określa się je mianem elicytorów, a zjawisko elicytacją (10). Indukcja aktywności GST, PO i biosyntezy GSH za pomocą elicytorów, związków mało lub nietoksycznych, mogłaby prowadzić do zwiększenia efektywności fitoremediacji przez określone gatunki roślin. Prowadzono szczegółowe badania nad rolą GST w detoksykacji herbicydów u zbóż (11,12), stosunkowo mało jednak ukazało się prac poświęconych znaczeniu tego enzymu w detoksykacji zanieczyszczonego środowiska przez rośliny dziko rosnące.

Celem pracy było badanie indukcji aktywności GST, PO oraz stężenia glutationu przez ksenobiotyk, substrat i elicytory oraz określenie zdolności pobierania 4-chlorofenolu z podłoża przez mozgę trzcinowatą (*Phalaris arundinacea* L.).

2. Materiał i metody

Do badań użyto mozgę trzcinowatą (*Phalaris arundinacea* L.) wyselekcjonowaną z silnie zanieczyszczonych terenów przybrzeżnych rzeki Ner w miejscowości Lutomiernsk. Rośliny hodowano w warunkach szklarniowych w temperaturze 22°C, w cyklu 16/8 godzin dzień/noc. Poszczególne rośliny rosły w doniczkach w ziemi ogrodniczej lub w hodowli hydroponicznej na pożywce Hoaglanda.

Rośliny rozmnażano przez odcinanie pędów bocznych i ukorzenianie ich w kolbach z wodą. Ukorzenione pędy przenoszono do doniczek o pojemności 1 litra wypełnionych ziemią. W każdej doniczkach hodowano siedem roślin. Po czterech tygodniach rośliny traktowano 2 mM roztworami związków: 4-chlorofenolu (4CP), benzyloizotiocyanianu (BITC), kwasu salicylowego (SA), kwasu 3-aminomasłowego (BABA). Liście mozgi trzcinowatej rosnącej w poszczególnych doniczkach spryskiwano 20 ml odpowiedniego roztworu, a 80 ml roztworu wlewano do doniczek. Po 3, 6 i 9 dniach po traktowaniu oznaczano w liściach aktywność GST, PO oraz zawartość glutationu całkowitego, GSH i GSSG.

W celu oznaczenia aktywności enzymów pobierano 0,5 g liści, które następnie homogenizowano w 5 ml buforu fosforanowego o pH 7,0 zawierającego EDTA w ilości 0,03 g/100 ml, z dodatkiem 0,1 g PVP/100 ml. Homogenat wirowano i supernatant uży-

wano do oznaczeń aktywności enzymów. Aktywność S-transferazy glutationowej oznaczono wobec 1-chloro 2,4-dwunitrobenzenu metodą Navari-Izzo i Izzo (13), aktywność peroksydazy guajakolowej oznaczono wobec guajakolu metodą Maechly i Chance (14).

Do oznaczenia glutationu pobierano 0,5 g liści, które homogenizowano w 2,5 ml 5% TCA, homogenat wirowano. W supernatancie oznaczano glutation całkowity (GSH+GSSG), GSSG i GSH metodą Griffith (15).

W celu zbadania zdolności mozgi do pobierania z podłoża aromatycznego ksenobiotyku prowadzono również hodowlę hydroponiczną roślin w kolbach osłoniętych folią aluminiową. Ukorzenione pędy roślin umieszczono na pożywce Hoaglanda. Po dwóch tygodniach wzrostu, rośliny przenoszono do kolb zawierających 100 ml 0,02 mM roztworu 4CP. Po 3 i 6 dniach oznaczano zawartość 4CP w podłożu oraz aktywność GST i PO w liściach i korzeniach. Poziom 4CP w pożywce oznaczano metodą według Frébortová (16) zmodyfikowaną przez Araujo i wsp. (17).

Użyte w pracy związki pochodziły z firmy Sigma: kwas 5,5'-dwutiobis-(2-nitrobenzoesowy); reduktaza glutationowa; guajakol; kwas 3-aminomasłowy; kwas salicylowy oraz z firmy Fluka: glutation zredukowany; zredukowany fosforan dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego; 1-chloro-2,4-dwunitrobenzen; 2-winylopirydyna; 4-chlorofenol; benzyloizotiocyjanian.

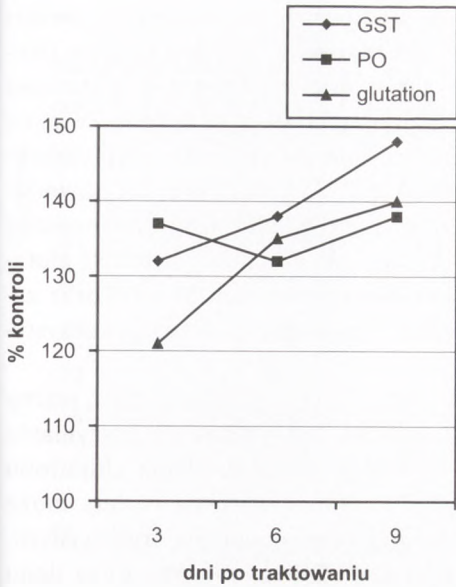
3. Wyniki i dyskusja

Spśród kilkunastu gatunków przebadanych roślin największą aktywnością GST charakteryzowała się mozga trzcinowata 2,1 U/g śm (g świeżej masy), podczas gdy np. pałka wodna wąskolistna 0,99 U/g śm. Ponadto biorąc pod uwagę częste zasiedlanie przez mózg trzcinowatą terenów silnie zanieczyszczonych, szybki wzrost i łatwość wegetatywnego rozmnażania wybrano ją do dalszych badań.

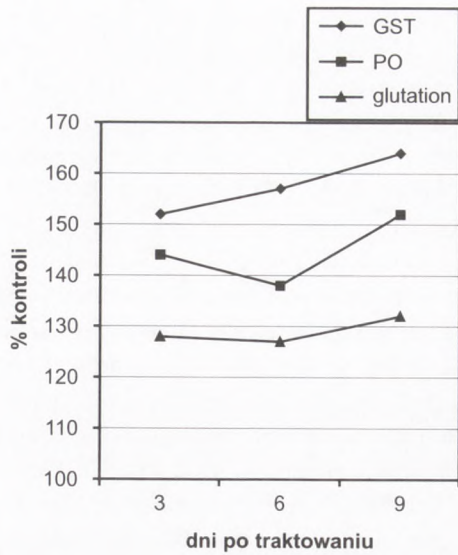
Do indukcji aktywności GST, PO i biosyntezy glutationu zastosowano: 4CP – przedstawiciela fenoli zanieczyszczających często środowisko, BITC – naturalny substrat GST, toksyczny metabolit wtórny występujący u niektórych roślin (18), BABA, SA – związki elicytujące reakcje obronne (19).

Wpływ związków fenolowych i innych ksenobiotyków na aktywność GST, PO i stężenie glutationu u roślin stwierdzono w różnych badaniach (20-24). U mozgi trzcinowatej 4CP powodował wzrost aktywności GST od 30 do 50% i PO od 30 do 40% w stosunku do kontroli. Zawartość glutationu wzrastała od 20 do 40% w stosunku do kontroli (rys. 1).

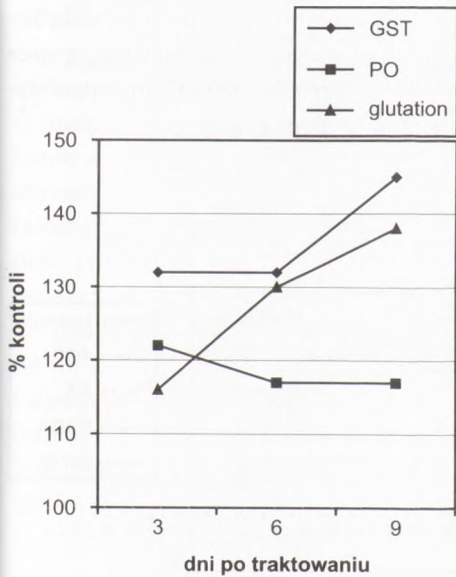
BITC to naturalny produkt hydrolizy glukozynolanów wykazujący działanie toksyczne w stosunku do patogenów i różnych organizmów zwierzęcych. Stwierdzono, że BITC może tworzyć koniugaty z glutationem w reakcji katalizowanej przez GST (25) oraz powoduje zwiększenie aktywności GST u owadów (26). U mozgi trzcinowatej traktowanej BITC aktywność GST wzrosła o 80% w stosunku do kontroli. Aktywność PO utrzymywała się na poziomie 70% powyżej kontroli (rys. 2).



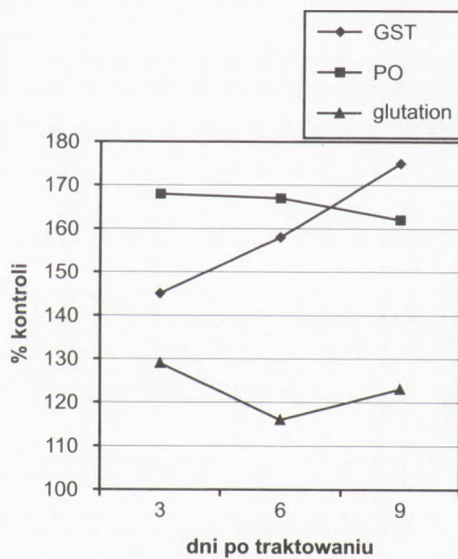
Rys. 1. Wpływ 4CP na aktywność GST, PO i zawartość glutationu.



Rys. 2. Wpływ BABA na aktywność GST, PO i zawartość glutationu.



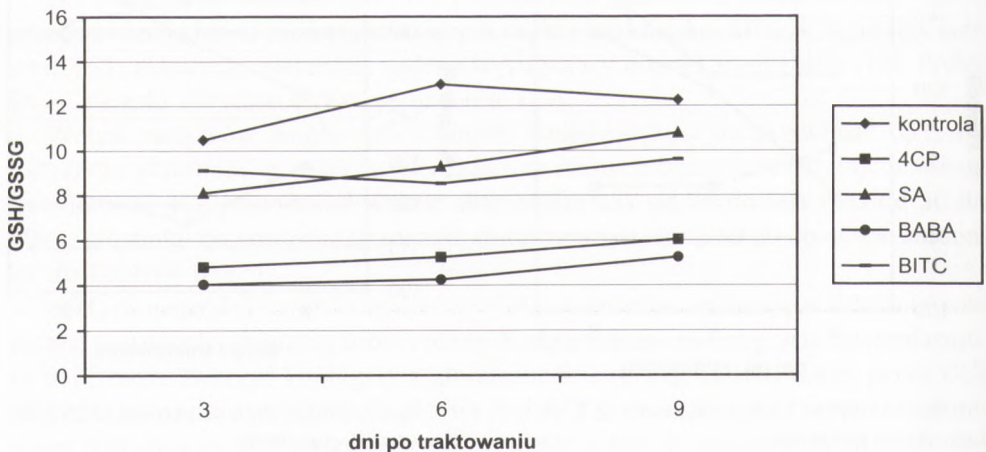
Rys. 3. Wpływ SA na aktywność GST, PO i zawartość glutationu.



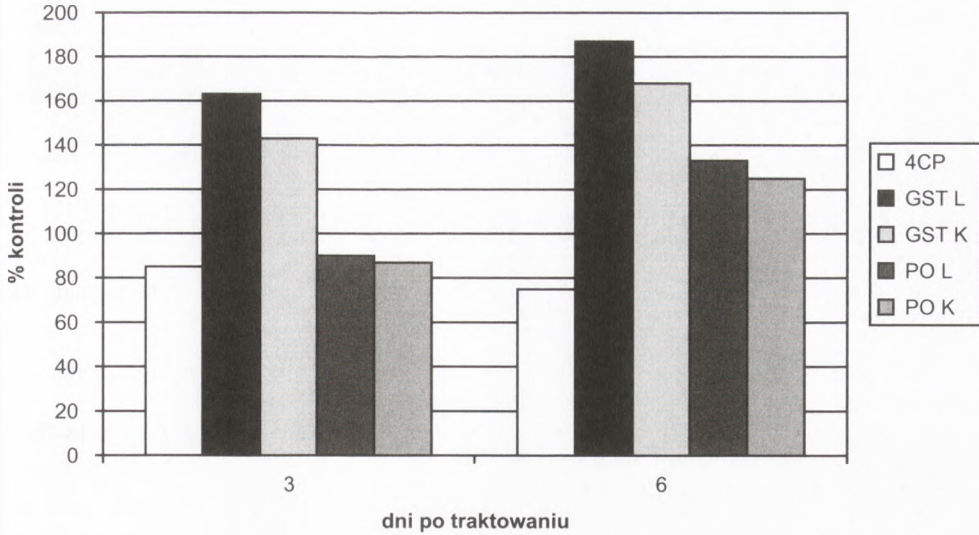
Rys. 4. Wpływ BITC na aktywność GST, PO i zawartość glutationu.

Znane jest zjawisko indukcji różnych reakcji obronnych u roślin narażonych na działanie biotycznych i abiotycznych czynników stresowych. U mozgi trzciniowatej traktowanej syntetycznym elicytorem – BABA aktywność GST zwiększała się o około 60% w stosunku do kontroli, aktywności PO od 40 do 50%, zawartość glutationu wzrosła o 30% (rys. 3). Następnym związkiem użytym jako elicytor był SA. Związek ten jest jednym z naturalnych przekaźników informacji w procesie aktywacji ekspresji genów związanych z odpornością roślin. W zawiesinie komórkowej soi powodował on kilkukrotny wzrost aktywności GST (19). Po traktowaniu mozgi trzciniowatej SA aktywność GST wzrosła o 50% w stosunku do kontroli. Również zawartość glutationu wzrosła o 40% (rys. 4). Możliwość zwiększenia aktywności GST i PO oraz zawartości glutationu przez elicytory może mieć duże znaczenie podczas wykorzystywania roślin w procesie fitoremediacji.

W neutralizacji zanieczyszczeń spowodowanych toksycznymi związkami, ważny jest nie tylko poziom glutationu, ale również stosunek GSH/GSSG (27). Utrzymanie wysokiego stosunku GSH do GSSG decyduje o efektywności działania glutationu jako antyoksydanta. W wyniku działania czynników stresowych na rośliny może nastąpić zwiększenie generowania reaktywnych form tlenu, rodników organicznych, które są szkodliwe dla organizmu. W procesie usuwania reaktywnych form tlenu GSH jest przekształcany do formy utlenionej. W obecności 4CP nastąpiło silne obniżenie stosunku GSH/GSSG (rys. 5). W przypadku SA stosunek GSH/GSSG tylko w niewielkim stopniu uległ obniżeniu. Natomiast po traktowaniu elicytorem BABA uległ on prawie dwukrotnemu obniżeniu. Obniżony stosunek mógł wynikać z tego, że proces utlenienia GSH zachodził szybciej niż jego regeneracja przy udziale reduktazy glutationowej. Traktowanie roślin SA może powodować intensyfikację procesu tworzenia kompleksów GSH-ksenobiotyk, nie obniżając potencjału antyoksydacyjnego.



Rys. 5. Stosunek GSH/GSSG w liściach mozgi.



Rys. 6. Porównanie między ubytkiem 4CP a aktywnością GST i PO w liściach (L) i korzeniach (K) u mozgi.

Zdolność roślin do pobierania fenoli wykazano niejednokrotnie w publikacjach (20,28). Transformowane korzenie marchwi linii B6 pobierały 46% fenolu z pożywki, po 24 godzinach inkubacji. Natomiast trójchlorofenol był pobierany tylko w 24% (17). Również Scragg i wsp. (29) wykazał, że 2,4-dwuchlorofenol był pobierany przez glon chlorellę. Początkowe stężenie 2,4-dwuchlorofenolu wynosiło 20 mg/l, po sześciu dniach jego stężenie spadało do 0,44 mg/l. Mozga trzcinowata rosnąca w hodowli hydroponicznej zmniejszyła zawartość 4CP w podłożu. Początkowe stężenie wynosiło 20 μ M, po sześciu dniach 15 μ M. Było to skorelowane ze wzrostem aktywności GST zarówno w liściach jak i korzeniach (rys. 6). Wzrost w trzecim dniu hodowli wynosił ponad 60% w liściach i 40% w korzeniach. Podczas gdy w szóstym dniu zwiększył się odpowiednio do 80 i 60%. Aktywność PO zwiększyła się dopiero po sześciu dniach hodowli o 40% w stosunku do kontroli.

Reasumując, mozga trzcinowata zasiedla tereny silnie zanieczyszczone, jest zdolna do pobierania chlorofenoli z podłoża, wykazuje wysoki poziom aktywności GST i zawartości glutationu, i może być on dodatkowo zwiększony przez elicytory. Na podstawie otrzymanych wyników przypuszcza się, że mozga trzcinowata może znaleźć szerokie zastosowanie w detoksykacji aromatycznych związków organicznych zanieczyszczających środowisko.

Praca częściowo finansowana z grantu KBN 6 PO4G 112/20.

Literatura

1. Salt D. E., Smith R. D., Raskin I., (1998), *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.*, 49, 643-668.
2. Chaudhry Q., Schröder P., Werck-Reichhart D., Grajek W., Marecik R., (2002), *Environ. Sci. & Pollut. Res.*, 9, 4-17.
3. Schäffner A., Messner B., Langebartels C., Sandermann H., (2002), *Acta. Biotechnol.* 22, 141-152.
4. Schröder P., Collins C., (2002), *Int. J. Phytoremed.*, 4, 247-265.
5. Coleman J. O. D., Blake-Kalff M. M. A., Davies T. G. E., (1997), *Trends Plant Sci.*, 2, 144-151.
6. Xiang C., Werner B. L., Christensen E. M., Oliver D. J., (2001), *Plant. Physiol.*, 126, 564-574.
7. Reade J. P. H., Cobb A. H., (2001), *Pest. Manag. Sci.*, 58, 26-32.
8. Stazi S. R., Fevereiro P., Sermanni G. G., Barros R. A., (2001), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76, 210-214.
9. Tausz M., Grill D., (2000), *Phyton*, 40, 111-118.
10. Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T., (2001), *Europ. J. Plant Pathol.*, 107, 19-28.
11. Cummis I., Cole D. J., Edwards R., (1997), *Pest. Biochem. Physiol.*, 59, 35-49.
12. Coleman J. O. D., Flova C., Schröder P., Tissut M., (2002), *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 9, 18-28.
13. Navari-Izzo F., Izzo R., (1994), *Plant Sci.*, 96, 31-40.
14. Maechly A. C., Chance B., (1954), *Methods Biochem. Anal.*, 1, 357-425.
15. Griffith O. W., (1980), *Anal. Biochem.*, 106, 207-212.
16. Frébortová J., (1995), *Biosc. Biotech. Biochem.*, 59, 1930-1932.
17. Araujo B. S., Charlwood B. V., Pletsch M., (2002), *Environ. Pollut.*, 117, 329-335.
18. Fahey J. W., Zalcomann A. T., Talalaj P., (2001), *Phytochemistry*, 56, 5-51.
19. Knörzer O. C., Lederer B., Durner J., Böger P., (1999), *Physiol. Plant.*, 107, 294-302.
20. Zheng Z., Shetty K., (2000), *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 932-937.
21. Mauch F., Dudler R., (1993), *Plant. Physiol.*, 102, 1193-1201.
22. Uotila M., Gullner G., Kömives T., (1995), *Physiol. Plant.*, 93, 689-694.
23. Flocco C. G., Lo Balbo A., Carranza M. P., Giuliett A. M., (2002), *Acta Biotechnol.*, 22, 43-54.
24. An-ping Lei., Yuk-shan Wong, Fung-ye Tam N., (2003), *Chemosphere*, 50, 293-301.
25. Dixon D. P., David J. C., Edwards R., (1998), *Plant. Mol. Biol.*, 36, 75-87.
26. Nakamura Y., Morimitsu Y., Uzu T., Ohigashi H., Murakami A., Naito Y., Nakagawa Y., Osawa T., Uchida K., (2000), *Cancer Lett.*, 157, 193-200.
27. Kocsy G., Galiba G., Brunold C., (2001), *Physiol. Plant.*, 113, 158-164.
28. Macek T., Macková M., Káš J., (2000), *Biotech. Adv.*, 18, 23-34.
29. Scragg A. H., Spiller L., Morrison J., (2003), *Enzyme Microb. Tech.*, 32, 616-622.