

**Jakub Żurawski*, Jacek Sikora*, Barbara Poniedziałek*,
Katarzyna Piwecka*, Mirosława Kaszkowiak*, Krzysztof Wiktorowicz*,
Sławomir Samardakiewicz****

**WPŁYW METALI CIĘŻKICH NA FLUORESCENCJĘ IZOLOWANYCH
CHLOROPLASTÓW *LEMNA MINOR***

**INFLUENCE OF HEAVY METALS ON FLURESCENCE OF ISOLATED
CHLOROPLASTS *LEMNA MINOR***

Słowa kluczowe: metale ciężkie, izolacja chloroplastów, cystometria przepływowa, skanujący mikroskop konfokalny.

Key words: heavy metals, isolations of chloroplasts, flow cytometry, scanning confocal microscopy.

The aim of this study was to evaluate the flow cytometry as a method for the assessment of autofluorescence emission of chloroplasts isolated from plants incubated with heavy metals.

*Lesser duckweed (*Lemna minor*) exposed to solutions of $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ and $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ was compared with control group of untreated plants. Both groups were cultured in the same conditions except for the addition of salts of heavy metals. After 14 days of incubation the chloroplasts were isolated and the autofluorescence was analysed by flow cytometry.*

In our study we observed that chloroplasts isolated from plants incubated with heavy metals were significantly smaller. Moreover, decrease in the quantity of chloroplasts in treated group as well as faster autofluorescence quenching were observed.

Results of flow cytometric analysis were confirmed in scanning confocal microscopy.

* *Dr n. biol. Jakub Żurawski, mgr Jacek Sikora, dr Barbara Poniedziałek, mgr Katarzyna Piwecka, mgr Mirosława Kaszkowiak i prof. dr hab. Krzysztof Wiktorowicz – Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań; tel./fax: 61 853 05 71; e-mail: zurawski@amp.edu.pl*

** *Dr Sławomir Samardakiewicz – Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel.: 61 829 56 48; e-mail: sas@amu.edu.pl*

1. WPROWADZENIE

Technika cytometrii przepływowej jest coraz szerzej używana do badania organelli roślinnych.

Pierwsze doniesienia w piśmiennictwie mówiące o przydatności cytometru przepływowego w badaniu komórek i organelli roślinnych dotyczyły reakcji roślin na regulację fotosyntezy w warunkach stresu. Yeng-Ping i in. [2002] opisali zmiany autofluorescencji w izolowanych chloroplastach. Także Schroder i Petit [1992] przedstawili wyniki badań, dotyczące różnic w wielkości i intensywności fluorescencji pod wpływem różnych czynników biochemicznych. Zmiany potencjału błonowego mitochondriów roślinnych również mogą być widoczne w badaniu cytometrycznym [Suzuki i in. 1994].

Uwagę zwracają doniesienia dotyczące wpływu metali ciężkich na fluorescencję chloroplastów roślinnych. Główne zagrożenie dla środowiska, a tym samym w pośredni sposób dla człowieka, stanowią sole ołowiu, kadmu i miedzi. Metale te mają także działanie hamujące na białka tylakoidów, które biorą udział w procesie fotosyntezy [Ventrella i in. 2009].

Badania wpływu metali ciężkich dotyczą nie tylko białek tylakoidów, ale także ilości chlorofilu oraz proporcji chlorofilu a do chlorofilu b.

Obserwacje są prowadzone zarówno metodami spektrofotometrycznymi, ale również przy użyciu mikroskopu elektronowego i cytometrii przepływowej [Niyitrai i in. 2003].

2. CEL PRACY

Celem badań była ocena intensywności fluorescencji w cytometrze przepływowym chloroplastów pochodzących od roślin inkubowanych z wodnymi roztworami soli metali ciężkich: $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ oraz $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, w stężeniach wodnych: 1 μM , 10 μM , 50 μM i 100 μM .

3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Grupę badaną i kontrolną stanowiła rzęsa drobna (*Lemna minor*). W grupie badanej do pożywki hodowlanej dodawano: $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ oraz $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, w stężeniach: 1 μM , 10 μM , 50 μM i 100 μM . Grupa kontrolna była prowadzona w takich samych warunkach hodowlanych, z pominięciem dodania soli metali ciężkich. Rośliny inkubowano w plastikowych butelkach do hodowli komórek zwierzęcych z hydrofobowym filtrem zapewniającym jednocześnie dostęp powietrza atmosferycznego i sterylne warunki. Po 14 dobach od założenia hodowli z roślin izolowano chloroplasty.

Z każdej hodowli pobierano po 5 g roślin, które wcześniej osuszano na bibule filtracyjnej. W kolejnym etapie umieszczano rośliny w nożykach o średnicy 35 μm (BD Biosciences).

ces-nr kat. 340590). Dodawano następnie po 500 μ l buforu do izolacji chloroplastów z albuminą bydlęcą (Sigma-nr kat. CP-ISO). Homogenizowano rośliny przez 60 sekund w Medimachine (Dako-nr kat. CN00130). Następnie zbierano z nożyka homogenizatora za pomocą strzykawki zawieszinę i przesączało przez filtr o średnicy oczek 35 μ m (BD Biosciences-nr kat. 340627).

Przesącz narawstwiająco na uprzednio przygotowany Perkol 40/80%. Tak przygotowany materiał wirowano przez 15 minut w gradiencie stężeń, z prędkością 3200 obrotów/minutę, w temperaturze 3°C. Następnie zbierano odwirowane, nieuszkodzone chloroplasty ze strefy pomiędzy stężeniami Perkolu [Aronsson 2003]. W kolejnym etapie umieszczano wyizolowane chloroplasty w próbówce i dodawano buforu do izolacji chloroplastów bez albuminy bydlęcej. Następnie trzykrotnie płukano je i wirowano z prędkością 1700 obrotów/minutę, w temperaturze 3°C.

Wszystkie czynności związane z izolacją chloroplastów były wykonywane na woreczkach z lodem. Na każdym etapie izolacji i przed odczytem w cytometrze przepływowym rośliny, a później chloroplasty, przechowywano w temperaturze 4°C w ciemności.

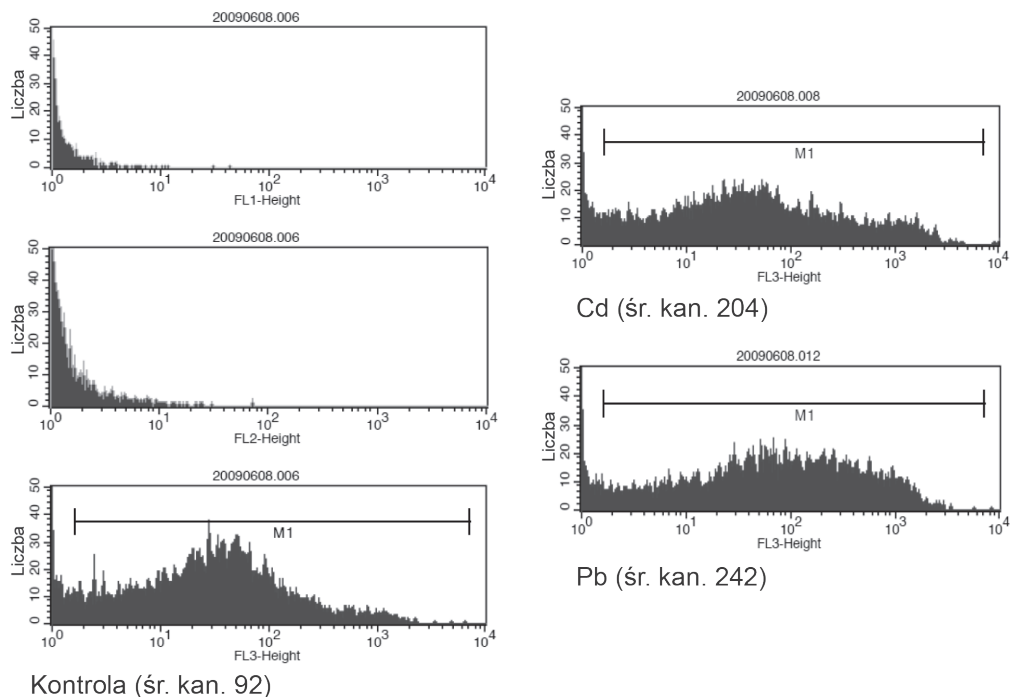
4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Widmo fluorescencji chloroplastów izolowanych z komórek hodowanych (rys. 1) w obecności wyższych stężeń jonów metali ciężkich (10 do 100 μ M) uległo wyraźnej zmianie i przesunięciu w stronę krótszych zakresów (z barwy czerwonej do pomarańczowej).

Chloroplasty izolowane z dwutygodniowej hodowli rzęsy drobnej w pożywkę zawierającej 10 μ M jonów ołowiu były wyraźnie mniejsze. Ich fluorescencja ulegała szybszemu wygaszeniu, a odzysk w trakcie izolacji był także znacznie mniejszy. Może to utrudnić ocenę wpływu metali ciężkich na fluorescencję chlorofilu roślin wyższych, ponieważ na zjawiska związane z fotoemisją nakładają się zjawiska związane z uszkodzeniem komórek ich organelli.

Inkubacja roślin z jonami miedzi i rtęci powoduje szybkie zahamowanie aktywności w fotoukładzie II. Z kolei nikiel, kobalt i mangan mogą wywoływać tylko niewielkie zahamowania tej aktywności. Interpretując pomiary emisji długości fal w kolorymetrze można stwierdzić, że niektóre metale ciężkie niszczą białka fotoukładu II, a inne tylko nieznacznie przyczyniają się do zmniejszenia ich aktywności [Ventrella 2009]. Długotrwała hodowla roślin z jonami kadmu powoduje natomiast odkładanie się ich w korzeniach, łodygach i liściach. Obraz z mikroskopu elektronowego ujawnił obecność elektronowo gęstych ziarnistości związanych przede wszystkim z wakuolami, ścianą komórkową i w cytoplazmie. Śladowe ilości jonów kadmu widoczne były w chloroplastach.

Carrier i in. [2003] sugerują, że szkodliwy dla roślin kadm jest odkładany w pierwszej kolejności w wakuolach i ścianach komórkowych korzeni i łodyg. Mechanizm ten zabezpiecza chloroplasty obecne w liściach przed toksycznym działaniem tego pierwiastka.



Rys. 1. Natężenie fluorescencji (wartość średniego kanału, śr. kan.) chloroplastów mierzone metodą cytometrii przepływowej. Kontrola (śr. kan. 92) – chloroplasty izolowane z komórek rzęsy hodowanych przez 2 tygodnie w pożywce standardowej, Cd – wzbogaconej w 1 μM jonów kadmu, Pb – wzbogaconej w 1 μM jonów ołowiu

Fig. 1. Fluorescence intensity (mean channel value) of chloroplasts, measured by flow cytometry. Control – chloroplasts isolated from plants cultured in standard medium for two weeks, Cd – cultivation in medium with an addition of 1 μM of cadmium ions, Pb – cultivation in medium with an addition of 1 μM of lead ions

Niskie stężenia ołowiu i kadmu są przyczyną różnic w wielkości chloroplastów. Zachodzące nieswoiste reakcje w tych organellach pod wpływem działania metali ciężkich są przyczyną oddziaływań na równowagę fitohormonalną [Nyitrai i in. 2003]. Również w cytometrze przepływowym można było zaobserwować różnice w wielkości chloroplastów. Dodatkowo wykonane przez nas badania w mikroskopie konfokalnym uwidocznily te różnice. Także zespół Nancharaiah przedstawił podobne wyniki [Nancharaiah i in. 2007]. Sheng i in. [2009] sugerują, że obraz widm absorpcyjnych chlorofilu jest związany z obecnością tlenu azotu, który łagodzi toksyczne działanie kadmu w chloroplastach. Tlenek azotu wpływa na aktywność elektronów związanych z fotosyntezą. Nie zbadano dotychczas na ile tlenek azotu może wpływać na różnice w wielkości chloroplastów [Sheng i in. 2009].

Uzupełnienie badań za pomocą mikroskopu elektronowego, konfokalnego i cytometru przepływowego może stanowić reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym. Badania te uwidoczniły różnice w koncentracji chlorofilu w fotoukładzie I i II pod wpływem działania jonów metalu. Kadm nie wpłynął znacząco na kompleks cytochromu b(6)f i ATP-syntazy. Odnotowano znaczne obniżenie poziomu białek w fotoukładzie I. Fagioni i in. [2009] stwierdzają, że w takim razie żadne nowe białko nie zostało zsyntetyzowane i żadne nie uległo całkowitemu zniszczeniu przez kadm w chloroplastach. Wnioskują, że niski poziom kadmu w chlorofilu wpływa na szybszą jego syntezę, gdzie jony kadmu są zastępowane prawdopodobnie przez inne metale wewnątrz białek fotoukładu. Możliwe, że podobne działanie wykazują także jony ołowiu.

5. WNIOSKI

Za pomocą cytometru przepływowego można obserwować intensywność fluorescencji izolowanych chloroplastów. W zależności od rodzaju soli metali ciężkich intensywność świecenia może różnie się kształtować. Także stężenie soli w środowisku hodowlanym ma wpływ na ten proces.

Ze względu na krótki czas przygotowania materiału do badań, a także łatwą metodę izolacji chloroplastów wymienione badania mogą znaleźć zastosowanie w wykrywaniu i monitorowaniu metali ciężkich w środowisku wodnym. Jednak do szczegółowego badania potrzebne będzie opracowanie standardów potrzebnych w przedstawionej metodyce.

Praca finansowana w ramach projektu KBN nr 2 P05D04630.

PIŚMIENICTWO

- ARONSSON H., JARVIS P. 2002. A Simple metod for isolating import-competent Arabidopsis chloroplasts. *Febs Letters* 529: 215–220.
- CARRIER P., BARYLA A., HAVAUX M. 2003. Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta* 216: 939–950.
- FAGIONI M., D'AMICI G., TIMPERIO A. et al. 2009. Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J. Proteome Res.* 8: 310–326.
- NANCHARAI Y., RAJADURAI M., VENUGOPALAN V. 2007. Single cell level microalal ecotoxicity assessment by confocal microscopy and digital image. *Environ. Sci. Technol.* 41: 2617–2621.
- NYITRAI P., BÓKA K., GASPAR L. et al. 2003. Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *J. Plant Physiol.* 160: 1175–1183.

- PETIT PX. 1992. Flow cytometric analysis of rhodamine 123 fluorescence during modulation of the membrane potential in plant mitochondria. *J. Plant Physiol.* 98: 279–286.
- SCHRODER WP., PETIT PX. 1992. Flow cytometry of spinach chloroplasts – determination of intactness and lectin binding properties of the envelope and the thylakoid membranes. *Plant Physiology* 100: 1092–1102.
- SHENG J., LIU K., SHEN L. 2009. Effects of exogenous nitric oxide on chlorophyll in cadmium-induced tomato seedlings. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.* 29: 762–764.
- SUZUKI K., EHARA T., OSAFUNE T. 1994. Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur J. Cell Biol.* 63: 280–288.
- VENTRELLA A., CATUCCI L., PILETSKA E. 2009. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studies by optical techniques. *Bioelectrochemistry* 77: 19–25.
- YENG-PING Y., YU-SIN J., BAN-DAR H. 2002. A quick method for assessing chloroplastic starch granules by flow cytometry. *Plant Physiology* 159: 103–106.