

А. Ф. Титов, В. В. Таланова, Н. М. Казнина

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ  
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ  
К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ**



КАРЕЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ

А. Ф. Титов, В. В. Таланова, Н. М. Казнина

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ  
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ  
К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ**

*Учебное пособие*

Петрозаводск  
2011

УДК 581.5(075.8)

ББК 28.58

Ф 50

Ф50 **Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М.** Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учебное пособие; Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. 77 с.  
ISBN 978-5-9274-0491-9

В учебном пособии изложены современные представления о физиологических основах устойчивости растений к действию тяжелых металлов. Рассмотрены наиболее важные вопросы, касающиеся поступления тяжелых металлов из окружающей среды в растения, их транспорта, накопления и гипераккумуляции, а также влияния на основные физиологические процессы. Особое внимание уделено механизмам металлоустойчивости, действующим на разных уровнях организации растений. Даны некоторые методические рекомендации по проведению экспериментов, направленных на изучение влияния тяжелых металлов на растения. Описаны основные методы физиологии растений, цитологии, молекулярной биологии, химического анализа, используемые в такого рода исследованиях.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «биология» и «экология». Представляет интерес для аспирантов и научных работников, занятых исследованиями в области экологии и охраны окружающей среды.

УДК 581.5(075.8)

ББК 28.58

**Рецензенты:**

доктор биологических наук *Л. В. Ветчинникова*  
кандидат биологических наук, доцент *Т. Г. Воронова*

ISBN 978-5-9274-0491-9

© Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., 2011

© Карельский научный центр РАН, 2011

© Институт биологии КарНЦ РАН, 2011

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1. Физиологическая роль тяжелых металлов как элементов минерального питания</b> .....	7
<b>Глава 2. Тяжелые металлы в системе «почва-растение»</b> .....	12
2.1. Природные и техногенные источники тяжелых металлов .....	13
2.2. Поступление и транспорт тяжелых металлов в растениях .....	17
2.3. Накопление и распределение тяжелых металлов в тканях и клетках растений .....	20
<b>Глава 3. Влияние тяжелых металлов на физиологические процессы растений</b> .....	23
3.1. Рост .....	23
3.2. Развитие .....	27
3.3. Фотосинтез .....	27
3.4. Дыхание .....	32
3.5. Водный обмен .....	33
3.6. Минеральное питание .....	35
3.7. Формирование продуктивности .....	37
<b>Глава 4. Механизмы устойчивости растений к действию тяжелых металлов</b> .....	39
4.1. Клеточные и молекулярные механизмы .....	39
4.2. Механизмы устойчивости, действующие на тканевом и организменном уровнях .....	53
<b>Глава 5. Гипераккумуляция тяжелых металлов растениями и возможности использования растений-гипераккумуляторов для фиторемедиации почв</b> .....	56
5.1. Гипераккумуляция тяжелых металлов растениями .....	57
5.2. Фиторемедиация почв, загрязненных тяжелыми металлами .....	62
<b>Глава 6. Методические рекомендации по проведению экспериментов, направленных на изучение влияния тяжелых металлов на растения и механизмов их металлоустойчивости</b> .....	66
<b>Рекомендуемая литература</b> .....	73
<b>Приложение 1. Перечень основных тяжелых металлов</b> .....	75
<b>Приложение 2. Список видов растений</b> .....	76

## СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АБС – транспортеры – ATF-binding cassette (АТФ-зависимые транспортеры)

АТФ – аденазинтрифосфорная кислота

Белки-транспортеры:

СAX – cation exchanger

CDF – cation diffusion facilitator

НМТ – heavy metal transporter

LCT – low-affinity cation transporter

MTP – metal tolerance protein

Nramps – natural resistance associated macrophage protein

ZAT – zinc transporter of *Arabidopsis thaliana*

ZIF – zinc induced facilitator

ZIP – zinc iron permease

ZNT – zinc transporter

БТШ – белки теплового шока

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИУК – индоллил-3-уксусная кислота

КБП – коэффициент биологического поглощения

МТ – металлотионеины

РБФК/О – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа

РНК – рибонуклеиновая кислота

PCS – фитохелатинсинтаза

ФС I – фотосистема I

ФС II – фотосистема II

ФСА – фотосинтетический аппарат

## ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия во всем мире усиливается загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами. В силу этого возрастание их содержания в почве, атмосфере и воде становится серьезной экологической проблемой. Тяжелые металлы надолго входят в круговорот органического вещества, усиливают естественные геохимические аномалии и создают новые – техногенные. В отличие от многих органических загрязняющих веществ тяжелые металлы невозможно удалить из окружающей среды путем естественной химической или биологической трансформации, так как они не деградируют и устойчивы в среде.

Опасность возрастания содержания тяжелых металлов в почве и атмосфере связана также с их активным поглощением и накоплением в растениях, что не только негативно отражается на жизнедеятельности самих растений, но и представляет серьезную угрозу здоровью человека и животных. В связи с этим в настоящее время проблеме устойчивости и адаптации растений к действию тяжелых металлов уделяют большое внимание во всем мире. Круг вопросов, посвященных этой проблеме, весьма широк. В частности, активно исследуются поглощение, транспорт и аккумуляция тяжелых металлов в тканях и органах растений, влияние токсичных ионов на основные физиологические процессы (рост, развитие, фотосинтез, водный обмен и минеральное питание), а также механизмы металлоустойчивости, действующие на разных уровнях организации. В связи с постоянно возрастающим интересом к исследованиям в этой области экологической физиологии растений, возникла необходимость разработки методов, которые позволили бы в полной мере оценить действие металлов на физиологические процессы растений, а также выявить механизмы устойчивости, позволяющие им произрастать на почвах с высоким содержанием тяжелых металлов. В частности, в последнее время ученые уделяют особое внимание изучению

способности некоторых видов растений к сверхнакоплению тяжелых металлов и возможности их использования для очистки загрязненных почв (фиторемедиации). Предпринимаются серьезные попытки создания устойчивых к избытку тяжелых металлов растений с использованием биотехнологических подходов, включая генную инженерию, а также клонирование и селекцию металлоустойчивых генотипов.

Настоящее учебное пособие ставит целью ознакомить студентов с современными представлениями о действии тяжелых металлов на растения. В пособии в сжатой форме представлены наиболее важные аспекты, касающиеся поступления тяжелых металлов в растения из почвы и их распределения по органам, тканям и внутри клетки, описано влияние токсичных ионов на основные физиологические процессы растений. Особое внимание уделено механизмам металлоустойчивости растений, действующим на разных уровнях организации. Даны некоторые методические рекомендации по организации и проведению исследований, направленных на изучение влияния тяжелых металлов на растения.

## ГЛАВА 1

### ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ КАК ЭЛЕМЕНТОВ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

К тяжелым металлам относят химические элементы, имеющие плотность более  $5 \text{ г/см}^3$  и атомную массу свыше 40 Да. С точки зрения значимости тяжелых металлов для растений их можно разделить на две группы: 1) необходимые в небольших концентрациях для жизнедеятельности растений (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), которые становятся токсичными только при значительном повышении их содержания в почве и растениях и 2) не участвующие в метаболизме растений (Cd, Hg, Pb, V) и токсичные даже в очень низких концентрациях.

Роль необходимых тяжелых металлов в жизнедеятельности растений чрезвычайно высока. Металлы-микроэлементы стимулируют синтез белков, жиров и углеводов, участвуют в процессах метаболизма, связываясь с биологически активными веществами (гормонами, витаминами, белками), стимулируют ростовые реакции, повышают иммунитет растений, способствуют повышению содержания хлорофиллов, оказывают стабилизирующее действие на зеленые пигменты при старении хлоропластов. Все это обуславливает применение ряда тяжелых металлов в качестве микроудобрений.

**Железо.** В почве содержание железа больше, чем любого другого элемента. Однако имеющееся в почве железо в форме  $\text{Fe}^{3+}$  недоступно растениям и для его усвоения оно должно быть восстановлено до  $\text{Fe}^{2+}$ . Чтобы обеспечить себя доступными формами железа, растения имеют различные механизмы его преобразования. У двудольных и злаковых однодольных видов реализуется стратегия I, при которой в корнях растений усиливается синтез органических кислот, хелатирующих (связывающих) ионы железа, находящиеся в почве. Хелатные комплексы попадают

на плазмалемму, где  $\text{Fe}^{3+}$  восстанавливается до  $\text{Fe}^{2+}$  при участии фермента Fe-хелатредуктазы. Двухвалентное железо переносится через мембрану специфическим Fe-транспортером. У злаков поглощение железа (стратегия II) происходит с участием специальных хелатирующих веществ – фитосидерофоров – непротеиногенных аминокислот, которые специфически связывают ион  $\text{Fe}^{3+}$  и переносят внутрь клетки. Во флоэму металл загружается также в хелатной форме.

В растениях железо выполняет целый ряд важных функций: участвует в восстановлении  $\text{NO}_3^-$  и фиксации азота клубеньковыми бактериями (входя в состав нитратредуктазы и нитрогеназы); входит в состав соединений, содержащих гем (все цитохромы, каталаза, пероксидаза); принимает участие в функционировании окислительно-восстановительных систем фотосинтеза и дыхания; катализирует начальные этапы синтеза хлорофилла (образование  $\gamma$ -аминолевулиновой кислоты и протопорфиринов); способствует улучшению роста растений на почвах, бедных фосфором и др.

При дефиците железа наблюдаются морфологические изменения пластид, снижается содержание хлорофилла, что обуславливает хлороз листьев, замедляется интенсивность фотосинтеза и дыхания, сокращается стадия плодоношения, уменьшается продуктивность растений.

**Кобальт.** Долгое время кобальт рассматривался как элемент, необходимый только для животных и микроорганизмов. В настоящее время его относят к металлам, необходимым и для высших растений. В растениях кобальт находится в свободной ионной ( $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Co}^{3+}$ ) и связанной форме. Он концентрируется в генеративных органах, накапливается в пыльце, ускоряя ее прорастание. У растений из семейства *Fabaceae* (Бобовые) металл стимулирует размножение клубеньковых бактерий. Кобальт усиливает биосинтез белка, регулирует ростовые процессы, снимает тормозящее действие ауксина на клеточное деление и ингибирует биосинтез этилена. Кроме того, кобальт входит в состав витамина  $\text{B}_{12}$  и повышает иммунитет к некоторым заболеваниям, принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, способствует повышению содержания пигментов в листьях, что

связано с возрастанием объема пластидного аппарата за счет репликации и роста органелл. Наряду с магнием и марганцем кобальт активирует фермент гликолиза фосфоглюкомутазу.

**Марганец.** Поступает в растения в виде  $Mn^{2+}$ . Локализуется в хлоропластах листьев. В растительных клетках участвует в системе выделения кислорода при фотосинтезе. Марганец входит в состав кислородовыделяющего комплекса фотосистемы II (ФС II), а также присутствует в молекуле фермента супероксиддисмутазы, участвующей, наряду с другими ферментами, в защите растения от активных форм кислорода. Кроме того, этот металл является активатором более 35 ферментов в клетке, в частности, малат- и изоцитратдегидрогеназы, участвующих в цикле Кребса. Наиболее важные функции марганца в растениях связаны со стимуляцией ферментов углеводного обмена, увеличением оттока сахаров в корень, усилением интенсивности дыхания и окисления углеводов. Помимо этого марганец способствует избирательному поглощению ионов из внешней среды, играет важную роль в механизме действия ИУК на рост клеток, повышает водоудерживающую способность тканей, снижает транспирацию. При недостатке марганца у растений наблюдается нарушение баланса основных элементов минерального питания, на листьях возникают характерные для марганцевого голодания точечные хлорозы, замедляется переход к цветению.

**Медь.** Незаменимый для растений элемент. Вопрос о том, в какой форме медь поступает в подземные и надземные органы –  $Cu^{2+}$  или  $Cu^+$  – в настоящее время дискутируется. В растениях до 98 % металла находится в нерастворимом связанном состоянии. Относительно богаты этим элементом семена и растущие части побега. В листьях большая часть меди сконцентрирована в хлоропластах и почти половина – в составе пластоцианина, одного из переносчиков электронов между ФС I и ФС II. Большинство функций меди связано с ее участием в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях. Кроме того, медь способствует образованию хлорофилла и замедляет его разрушение в темноте, влияет на азотный обмен, входя в состав нитритредуктазы и редуктаз оксида азота, усиливает процесс связывания молекул азота. Медь функционирует в цитохромоксидазном

комплексе дыхательной цепи митохондрий. Она также способствует поступлению в организм марганца, цинка и бора, повышает засухо-, морозо- и жароустойчивость, принимает активное участие в защите против болезнетворных микроорганизмов. Недостаток меди вызывает задержку роста растений и их цветения, приводит к потере тургора листьев.

**Молибден.** В растениях присутствуют ионы  $\text{Mo}^{4+}$  и  $\text{Mo}^{6+}$ . Транспортные формы молибдена практически не изучены. Предполагается, что он передвигается по растению в виде аниона  $\text{MoO}_4^{2-}$ . В растениях содержание металла зависит от вида растения и почвенно-климатических факторов. Как правило, у бобовых, способных к повышенной фиксации азота, в органах накапливается больше молибдена, чем в растениях из других семейств. Молибден является кофактором ряда ферментов, например, нитратредуктазы и нитрогеназы, и таким образом принимает участие в восстановлении нитратов. Основные биохимические функции молибдена связаны с его способностью изменять свою валентность и участвовать в реакциях комплексообразования. Кроме того, он оказывает влияние на уровень накопления аскорбиновой кислоты. Недостаток молибдена отражается на метаболизме азота и, соответственно, росте растений, а также приводит к деформации листьев.

**Никель.** Необходимость никеля для растений как микроэлемента была установлена лишь в 1987 году П. Брауном. В растении он представлен в виде  $\text{Ni}^{2+}$ . Никель входит в состав ряда ферментов, наиболее изученным из которых является уреазы, участвующая в расщеплении мочевины. Помимо этого никель активизирует работу ряда ферментов (пептидаз, нитратредуктазы), стабилизирует структуру рибосом, влияет на поступление и транспорт питательных веществ. До сих пор четких доказательств проявления дефицита никеля у растений нет. В экспериментальных условиях недостаток металла вызывает нарушения метаболизма мочевины.

**Цинк.** В растениях цинк находится в двухвалентной форме в виде свободного иона  $\text{Zn}^{2+}$  или в составе комплексов с органическими соединениями. Цинк играет важную роль в азотном, углеродном и фосфорном обменах, способствует синтезу нуклеино-

вых кислот и белка. Входит в состав более 200 ферментов (щелочной фосфатазы, алкоголь- и лактатдегидрогеназы и т. д.). Активирует карбоангидразу, катализирующую реакцию дегидратации в процессе фотосинтеза. Цинк играет важную роль в синтезе ИУК, что связано с его участием в образовании аминокислоты триптофана. Подкормка цинком способствует увеличению содержания ауксинов в тканях и активирует рост клеток. Цинк способствует повышению устойчивости растений к стрессовым воздействиям. При недостатке цинка в растениях накапливаются редуцирующие сахара, небелковые соединения азота, органические кислоты, уменьшается содержание сахарозы и крахмала, нарушается синтез белка. Дефицит цинка приводит также к нарушениям фосфорного обмена. Кроме того, у растений резко уменьшается митотическая активность клеток корневой меристемы, нарушается растяжение и дифференциация клеток, увеличивается число хромосомных aberrаций. В листе при недостатке этого элемента подавляется скорость деления клеток мезофилла, что приводит к морфологическим изменениям листьев. Наиболее характерный признак цинкового голодания – задержка роста междоузлий и развитие розеточности листьев.

## ГЛАВА 2

### ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ В СИСТЕМЕ «ПОЧВА-РАСТЕНИЕ»

Естественный фон тяжелых металлов, как правило, невелик, и только в районах рудных месторождений обнаружены высокие уровни содержания некоторых из них (Co, Fe, Ni, Pb и Zn). Значительное же повышение концентраций тяжелых металлов в окружающей среде связано с хозяйственной деятельностью человека, в первую очередь, с интенсивным развитием современной промышленности и сельского хозяйства. Например, в России известно большое число техногенных геохимических территорий



Рис. 1. Основные источники поступления тяжелых металлов в окружающую среду (Титов и др., 2007)

с высоким содержанием тяжелых металлов, площадь которых охватывает около 18 млн га. Поскольку тяжелые металлы относятся преимущественно к рассеянным химическим элементам, то загрязнению ими подвергается не только почвенный покров, но и гидросфера, и атмосфера. В силу этого, повышение концентрации этих элементов в окружающей среде, наблюдаемое в последние десятилетия, носит не только локальный, но и глобальный характер.

Основные источники поступления тяжелых металлов в окружающую среду можно разделить на природные (естественные) и техногенные (рис. 1).

## **2.1. Природные и техногенные источники тяжелых металлов**

***Природные источники тяжелых металлов.*** К естественным источникам в первую очередь относятся горные породы, из продуктов выветривания которых сформировался почвенный покров (см. рис. 1). В земной коре тяжелые металлы приурочены к определенной группе минералов и образуют большое количество природных химических соединений – сульфатов, сульфидов, фосфатов, карбонатов и др. Количество минералов, в состав которых входят тяжелые металлы, колеблется от 16 (для Hg) до 200 (для Cu и Pb). При этом некоторые металлы встречаются совместно в залежах полиметаллических руд. Например, в число рудных компонентов месторождений свинца входят Ag, Au, Cd, Cu, Hg, Se, Zn и ряд других элементов. В свою очередь свинец является постоянным элементом-спутником в рудах других металлов – Au, Cu, Mo, Sn, W. Средние концентрации некоторых тяжелых металлов в земной коре, почве и растениях представлены в табл. 1. При выветривании горных пород простые и комплексные ионы металлов могут входить в глинистые минералы, связываться органическим веществом почвы, а также поступать в атмосферу, поверхностные и грунтовые воды.

Важным естественным источником поступления тяжелых металлов в атмосферу являются вулканы. Например, масса свинца, выбрасываемая при извержениях вулканов, обычно составляет от  $30 \cdot 10^6$  до  $300 \cdot 10^6$  т/год, а цинка – около  $216 \cdot 10^3$  т/год. Из

газовой фазы тяжелые металлы адсорбируются дисперсными твердыми продуктами выбросов и переносятся воздушными потоками. Кроме того, природными источниками загрязнения воздуха тяжелыми металлами могут быть: дым лесных пожаров, космическая пыль, эрозия почв, испарение с поверхности морей и океанов, а также выделение этих элементов растительностью.

Таблица 1

**Среднее содержание тяжелых металлов в земной коре, почве и растениях (по: Башмаков, Лукаткин, 2009)**

Металл	Среднее содержание химического элемента		
	в земной коре, %	в почве, %	в растениях, мкг/г сухой массы
Cd	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	60
Co	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	10
Cr	$8,3 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$	23
Cu	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	1 400
Fe	4,65	3,8	14 000
Mn	0,1	$8,5 \cdot 10^{-2}$	63 000
Mo	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	90
Ni	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	300
Pb	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	270
Zn	$8,3 \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	10 000

Естественные уровни тяжелых металлов в почвах подвержены определенным колебаниям и зависят от состава почвообразующих пород, рельефа местности и климата.

Концентрацию металла, которая существовала в регионе до появления промышленной деятельности, называют ее естественным, или **фоновым** уровнем. Знание фонового уровня является основой для оценки степени загрязнения тяжелым металлом окружающей среды.

**Техногенные источники тяжелых металлов.** Основной источник поступления тяжелых металлов в окружающую среду – техногенный. Это в первую очередь выбросы предприятий, особенно горнодобывающей, металлургической, химической и энергетической промышленности (см. рис. 1). Например, в воздухе на территории ряда машиностроительных предприятий обнару-

жено до 2 800 мг/м<sup>3</sup> свинца, а при производстве цемента – до 1 400 мг/м<sup>3</sup>. В почве около одного из цинкоплавильных заводов в Польше на глубине 1–5 см содержалось цинка 13 800, свинца – 2 480, кадмия – 270 мг/кг сухого веса. Карелия является сравнительно чистым регионом в отношении содержания тяжелых металлов в окружающей среде, однако в ряде районов республики наблюдается заметное повышение их уровня (в частности, свинца и цинка) в почве (рис. 2).

Увеличению концентрации тяжелых металлов в воздухе и почве способствует также сжигание топлива и горючих ископаемых. При этом, если загрязнение от промышленных предприятий, как правило, носит локальный характер, то выбросы при сжигании топлива распространяются повсеместно.

Транспортные средства – один из главных источников загрязнения почв и растений тяжелыми металлами. Около 60–70 % всех выбросов в атмосферу свинца связано с использованием свинецсодержащего бензина. Вдоль дорог с активным движением автотранспорта свинцом может загрязняться полоса земли шириной 50–100, а иногда и 300 м. Установлено, что содержание свинца в почвах вблизи автомагистралей в десятки и сотни раз превышает фоновые значения. Помимо свинца с выхлопными газами автотранспорта выбрасываются Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Sr, Zn.

Среди антропогенных источников поступления тяжелых металлов в почву определенную роль играют и агротехнические мероприятия: внесение удобрений, пестицидов, использование сточных вод для орошения. В частности, при использовании минеральных удобрений в почву вносится свинца от 7 до 225 мг/кг сухой массы почвы, кадмия – от 0,3 до 179 мг/кг сухой массы. Даже при относительно небольшом содержании кадмия в фосфорных удобрениях, его ежегодное поступление в почву составляет около 10 г/га. Сточные воды, используемые в сельском хозяйстве, также являются источником загрязнения почв тяжелыми металлами. Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn чаще всего становятся основными токсикантами, ограничивающими возможность применения осадков сточных вод в качестве удобрения.

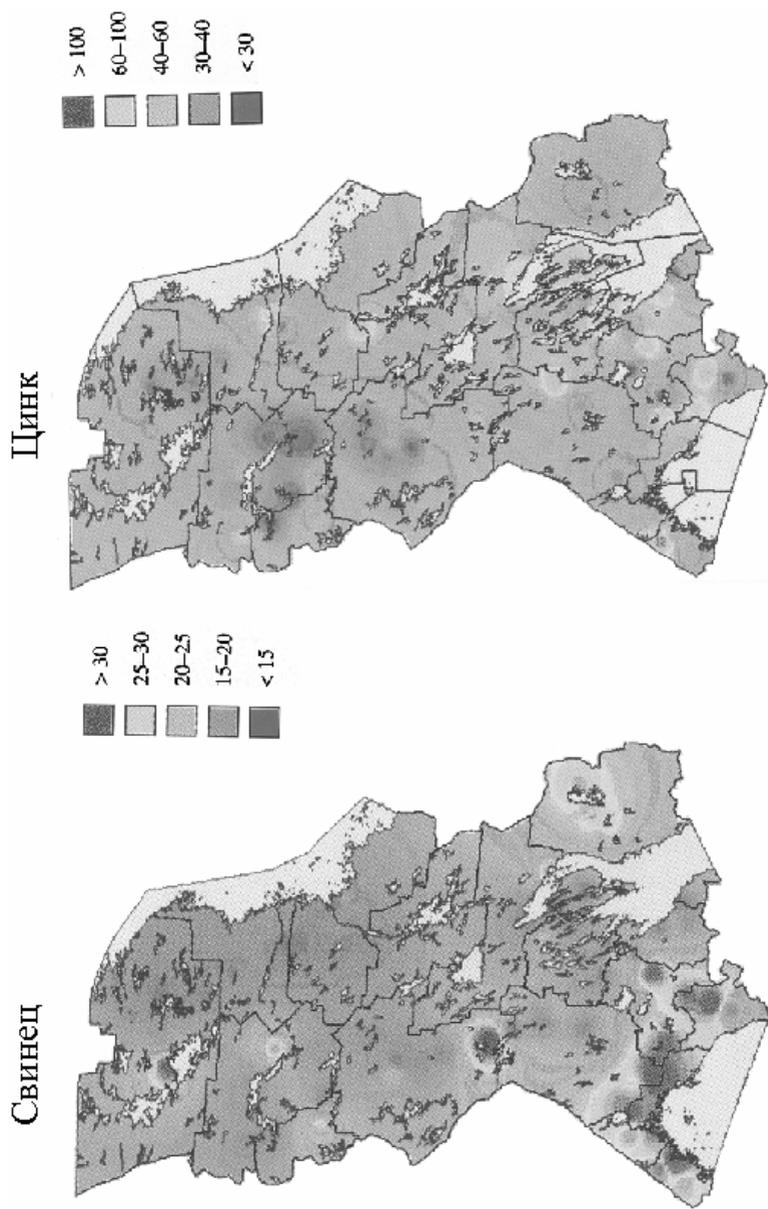


Рис. 2. Картохема содержания свинца и цинка (мг/кг) в верхнем горизонте почв Карелии (Федоренко и др., 2008)

Таким образом, в регионах с развитым промышленным и сельскохозяйственным производством резко возрастает вероятность загрязнения воздуха, почвы и воды избыточным количеством тяжелых металлов, что представляет серьезную опасность для здоровья человека и животных.

## **2.2. Поступление и транспорт тяжелых металлов в растениях**

*Поступление тяжелых металлов в растения.* Повышение содержания тяжелых металлов в окружающей среде приводит к значительному увеличению их концентрации в растениях. При этом наземные растения способны поглощать токсичные ионы из двух источников – почвы и воздуха.

Механизмы поступления металлов в растения *из почвы* корневым путем включают пассивный (неметаболический) перенос ионов в клетку в соответствии с градиентом их концентрации и активный (метаболический) процесс поглощения клеткой против градиента концентрации. В поглощении и транспорте тяжелых металлов в растения можно выделить следующие этапы: 1) накопление ионов в свободном пространстве корня; 2) преодоление ионами мембранного барьера и их проникновение в симпласт; 3) радиальное передвижение ионов по тканям корня и сосудистым проводящим пучкам. Первый этап поглощения тяжелых металлов корневой системой осуществляется посредством физико-химической адсорбции, а также за счет неметаболического связывания ионов металлов активными участками клеточной стенки. Последующие этапы поглощения металлов связаны с затратой энергии с участием ионных каналов и белков-переносчиков. Помимо симпластного пути ионы тяжелых металлов могут передвигаться и по апопласту до поясков Каспари (рис. 3).

Способность растений поглощать тяжелые металлы из почвы характеризуется коэффициентом биологического поглощения (КБП), представляющим собой отношение содержания металла в растении к его содержанию в почве. Например, КБП свинца для многих растений (овес, кукуруза, горох и т. д.) составляет 0,001–0,005, а КБП кадмия для этих же культур – 0,01–0,5. Отсюда следует, что одни и те же виды растений поглощают значительно больше кадмия, чем свинца.

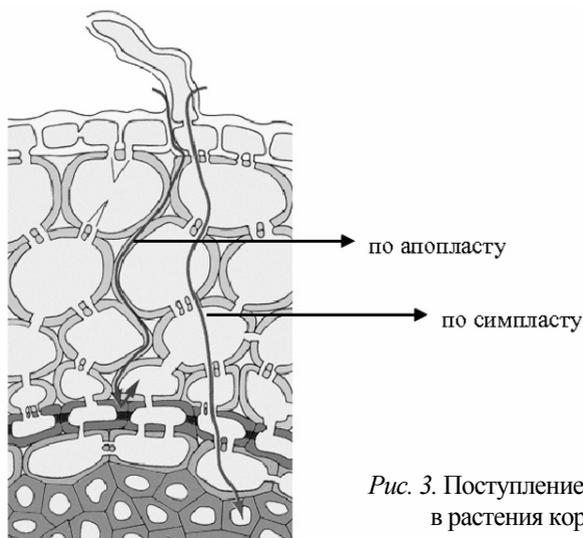


Рис. 3. Поступление тяжелых металлов в растения корневым путем

На поступление тяжелых металлов из почвы в растения оказывает влияние большое число разнообразных факторов. К наиболее важным из них относятся:

- механический состав почвы;
- химический состав почвы (органическое вещество, содержание карбонатов, фосфатов и других солей);
- рН почвенного раствора;
- взаимодействие металлов;
- температура почвы и воздуха;
- валентность элемента, его физико-химические свойства;
- биологические особенности вида;
- возраст растений;
- сезон года и т. д.

**Из воздуха** тяжелые металлы в составе аэрозолей и пыли попадают на лист, удерживаются на нем в виде поверхностных отложений, часть их может быть вымыта дождевой водой, а часть поступает в растение. Механизм поглощения ионов тяжелых металлов листьями состоит из двух фаз: 1) неметаболического проникновения через кутикулу (которое рассматривается как главный путь поступления) и 2) метаболического переноса

ионов через плазматические мембраны и протопласт клеток, т. е. их накопление против градиента концентрации (рис. 4). Ионы металлов, поступившие в лист через кутикулу и устьица, транспортируются в корни и/или выше расположенные органы. Доля внекорневого поступления тяжелых металлов в растения зависит от концентрации металла в воздухе и осадках, его физико-химических свойств, а также анатомо-морфологических особенностей листьев растений. В частности, чем сильнее опушенность или шероховатость листовой поверхности, тем интенсивнее поступают в них металлы из воздуха.

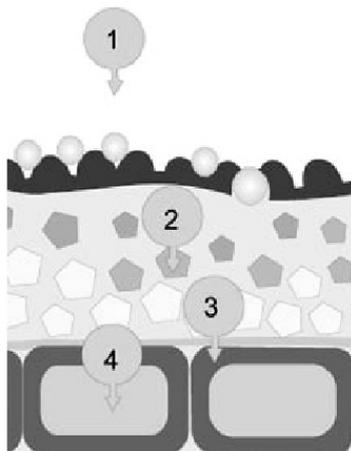


Рис. 4. Поступление тяжелых металлов через лист:  
1 – устьица; 2 – кутикула; 3 – апопласт; 4 – симпласт

**Транспорт тяжелых металлов по растению.** Основной путь ионов тяжелых металлов в корнях можно представить следующим образом: двухэтапное поглощение (диффузия и адсорбция), транспорт по апопласту и симпласту до эндодермы и в базальные участки корня. Проникновение их в центральный цилиндр происходит через молодую эндодерму со слабо развитыми поясками Каспари, а также частично через избирательно проницаемые мембраны протопласта в эндодерме. Из корней металлы транспортируются в надземные органы по сосудам ксилемы с транспирационным током. Для большинства ионов тяжелых металлов предполагается общий механизм транспорта по ксилеме. Показано, что ионы могут перемещаться по ксилеме в форме катионов, а также в виде комплексов с аминокислотами (аспарагином, глутамином, гистидином) или органическими кислотами (лимонной, fumarовой, малоновой). Дальний транспорт тяжелых металлов у растений может происходить и по сосудам флоэмы в составе комплексов с цитратами, никотинаминами или металло-связывающими белками.

### 2.3. Накопление и распределение тяжелых металлов в тканях и клетках растений

Растения по способности накапливать тяжелые металлы разделяют на три группы (Baker, 1981):

1) **аккумуляторы**, накапливающие металлы главным образом в надземных органах как при низком, так и высоком содержании их в почве;

2) **индикаторы**, концентрация металла в которых отражает его содержание в окружающей среде;

3) **исключатели**, накапливающие металлы в основном в корнях, поступление ионов в побеги ограничено даже при высокой их концентрации в окружающей среде.

На содержание металла в корнях и побегах оказывает влияние его количество в почве, а также вид растения, фаза развития, сезон года и т. д.

В отличие от накопления характер распределения тяжелых металлов по органам и тканям в большинстве случаев не зависит от эдафических и сезонных факторов и определяется, главным образом, свойствами металлов и видовыми особенностями растений.

Большинство произрастающих на Земле видов растений являются исключателями. Типичное распределение металлов по органам у этих видов, на примере кадмия, приведено на рис. 5. Наибольшее количество металла содержится в корне растений ячменя, а затем его содержание в разных органах уменьшается в следующем порядке: корень > стебель ≥



Рис. 5. Распределение кадмия по органам растений ячменя (по: Vassilev et al., 1998)

листья > плоды или семена. Способность корней задерживать тяжелые металлы имеет большое биологическое значение, связанное со снижением транспорта токсичных ионов в надземные органы растений и защитой от их воздействия основного органа фотосинтеза – листа, а также органов репродуктивной сферы.

Растения-аккумуляторы накапливают в надземных органах значительное количество тяжелых металлов, многократно превышающее их концентрации в почве. Произрастая на почвах геохимических аномалий, они сформировали конститутивные механизмы устойчивости, позволяющие им аккумулировать токсичные элементы в метаболически инертных органах и органеллах или включать их в хелаты и тем самым переводить в физиологически безопасные формы. Среди аккумуляторов выделяют растения *гипераккумуляторы (сверхнакопители)*, способные накапливать в надземной биомассе чрезвычайно высокие концентрации тяжелых металлов без каких-либо отрицательных последствий для жизнедеятельности.

***Распределение тяжелых металлов в тканях и клетках растений.*** В тканях корня большая часть тяжелых металлов локализована в ризодерме, коре и эндодерме. Структурные особенности клеток этих тканей ограничивают поступление токсичных ионов в сосуды ксилемы, а, следовательно, и в надземные органы растения. При этом эндодерме с поясками Каспари отводится основная барьерная роль в транспорте тяжелых металлов в корне. В перицикл и сосуды ксилемы металлы поступают лишь при высоких их концентрациях в почве. Слабо изучено проникновение тяжелых металлов в меристематические ткани корня. Хотя с помощью радиографического и спектрометрического анализов было обнаружено присутствие изотопов Cd и Zn в апикальной меристеме корней пшеницы.

Сведений о распределении тяжелых металлов в тканях листьев и стебля растений сравнительно немного. Выявлено преимущественное их накопление в клетках эпидермиса и довольно низкое – в мезофилле. Например, при высокой концентрации цинка (400 мкМ/л) в растворе у растений ячменя в клетках эпидермиса его содержание увеличивалось в 19 раз, тогда как в клетках мезофилла – лишь в 2,5 раза. Такое распределение

металлов рассматривается как способ защиты хлоропластов и, следовательно, процесса фотосинтеза от их негативного влияния.

Распределение тяжелых металлов в клетке неравномерно. Значительная часть поступивших ионов металлов задерживается в клеточной стенке клеток корня и листа, что считается одним из наиболее важных механизмов защиты растений от их токсического действия (табл. 2). При дальнейшем повышении концентрации металла в корнеобитаемой среде его ионы проникают через клеточную стенку и плазмалемму в цитоплазму клеток. Избыток ионов металлов в цитозоле связывается различными хелатирующими агентами (органическими кислотами, фитохелатинами, металлотионеинами и др.) и в виде комплексов удаляется в вакуоль, исключая их из метаболически активных компартментов клетки. Поэтому в хлоропластах, а также в митохондриях и ядре, как правило, обнаруживаются лишь незначительные количества тяжелых металлов.

*Таблица 2*

**Содержание цинка (нмоль/г сырого веса) и его распределение в клетке листа растений ячменя (по: Brune et al., 1994)**

Клеточный компартмент	Содержание цинка в растворе, мкМ/л	
	2	400
Протопласт мезофилла	60	149
Вакуоль	4	95
Хлоропласт	28	30
Цитоплазма	55	54

Таким образом, растения способны поглощать и накапливать не только ионы тяжелых металлов, необходимых для их жизнедеятельности, но и металлов, функциональная роль которых пока не установлена. На уровне целого растения градиент концентрации тяжелых металлов уменьшается от корня к соцветию, что означает ограниченное их поступление в репродуктивные органы (соцветия, плоды, семена). На уровне тканей значительное количество металлов локализуется в ризодерме, коре и эпидермисе. На клеточном уровне избыток металлов аккумулируется в связанном малоактивном состоянии в клеточной стенке и вакуоли, благодаря чему снижается их токсическое действие на цитоплазму.

## ГЛАВА 3

### ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ

Токсичность тяжелых металлов для растений связана с их физическими и химическими свойствами, среди которых следует отметить:

- *электроотрицательность* (высокая электроотрицательность позволяет ионам металлов взаимодействовать с активными центрами молекул ферментов, подавляя активность последних);
- *степень ионизации* (которая влияет на адсорбцию металла поверхностью клетки и на проникновение его через клеточные мембраны);
- *гидратация ионов* (за счет которой образуется оболочка, препятствующая взаимодействию с компонентами окружающей среды, но не влияющая на токсичность самого металла; поскольку и степень гидратации, и подвижность ионов снижаются с повышением атомной массы, то для более тяжелых элементов, расположенных в правой части периодической системы химических элементов Д. И. Менделеева и имеющих большее число электронных оболочек и больший радиус, токсичность увеличивается).

#### 3.1. Рост

*Влияние тяжелых металлов на рост делением и растяжением.* Торможение роста является наиболее общим проявлением токсичности тяжелых металлов для растений, что связано в первую очередь с их прямым действием на деление и растяжение клеток.

Известно, что наиболее интенсивно деление клеток происходит в апикальных меристемах корня и побега, и формирование

всех органов растения связано в первую очередь с функционированием меристематических клеток. Изучение митотической активности клеток меристемы корня у разных видов растений (гороха, лука, ячменя, *Crepis capillaries*, *Lathyrus odoratus*) показало, что в присутствии тяжелых металлов в высоких концентрациях замедляется интенсивность клеточных делений, уменьшается количество клеток на всех фазах митоза, увеличивается продолжительность отдельных фаз и всего митотического цикла. Помимо отрицательного влияния на митотическую активность клеток, тяжелые металлы могут замедлять пресинтетический (G1) и постсинтетический (G2) этапы клеточного деления.

Повышенные концентрации тяжелых металлов могут вызывать в меристематических клетках корней различные цитогенетические нарушения: сильную спирализацию хромосом во всех фазах клеточного деления, неравное расхождение хромосом к полюсам клетки или полное отсутствие расхождения, появление тетраплоидных клеток. Некоторые тяжелые металлы (Cd, Ni) вызывают также повреждение ядра, нарушают синтез РНК и ингибируют активность рибонуклеазы. Эти металлы обладают также мутагенным действием и могут вызывать хромосомные aberrации.

Сведения о влиянии тяжелых металлов на апикальные меристемы стебля единичны. Известно лишь, что высокие их концентрации приводят к уменьшению размеров апекса побега, снижению темпов заложения на нем вегетативных и репродуктивных органов.

В основе всех отмеченных выше нарушений клеточного деления, прежде всего, лежит способность связывания ионов металлов с сульфгидрильными группами белков и ферментов, ответственных за прохождение митоза, в результате чего эти белки теряют свою активность.

Тяжелые металлы оказывают сильное негативное действие и на растяжение клеток. Механизм такого воздействия связан в первую очередь со снижением эластичности клеточных стенок. Обладая большим сродством к SH-группам, ионы металлов образуют прочные связи с белками, входящими в состав клеточной стенки, тем самым препятствуя ее растяжению. Уменьшение эластичности клеточных стенок в присутствии тяжелых металлов может быть также обусловлено повреждением структуры микро-

трубочек и нарушением водного режима клеток. Кроме того, способствуя образованию активных форм кислорода и других свободных радикалов, металлы вызывают окисление компонентов клеточных стенок, что также отрицательно отражается на росте растяжением.

Помимо отмеченного выше непосредственного влияния тяжелых металлов на деление и растяжение клеток, необходимо отметить их опосредованное действие, вызванное, например, нарушениями минерального питания, гормонального баланса, а также связанное с ингибированием процессов фотосинтеза и дыхания.

В обобщенном виде основные «мишени» токсического действия тяжелых металлов на деление и растяжение клеток (на примере свинца и кадмия) представлены на схеме (рис. 6).

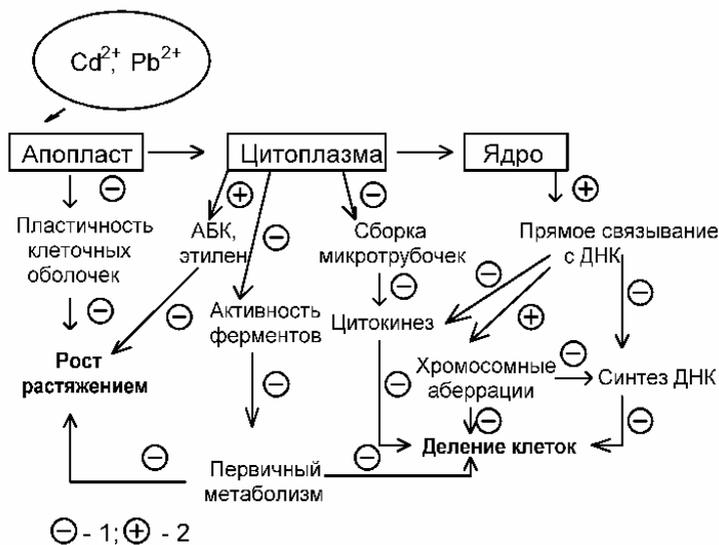


Рис. 6. Влияние тяжелых металлов на деление и растяжение клеток растений (по: Серегин, Иванов, 2001):

1 – ингибирование, уменьшение; 2 – активация, увеличение

**Влияние тяжелых металлов на прорастание семян.** Процесс прорастания семян является довольно устойчивым к действию тяжелых металлов. Поскольку ионы металлов локализируются

преимущественно в клеточных стенках семенной оболочки и не проникают в зародыши, семена способны прорасти при значительных их концентрациях в окружающей среде. Однако дальнейшее повышение концентрации тяжелых металлов (для Cd и Pb – до  $10^{-2}$ М) резко замедляет или полностью блокирует процесс прорастания. При изучении механизма воздействия тяжелых металлов на прорастание семян обнаружено, что они проникают через семенную оболочку на заключительной стадии набухания и вызывают задержку прорастания за счет ингибирования процессов деления и растяжения клеток зародыша.

***Влияние тяжелых металлов на рост корня и побега.*** Возрастающие дозы тяжелых металлов вызывают у растений в первую очередь замедление роста корней. Это связано с тем, что корни являются первым барьером на пути поступления металлов из почвы в растение, и именно корень берет на себя основную функцию по их аккумуляции. Под влиянием тяжелых металлов уменьшаются длина главного корня и количество боковых корней, отмирают корневые волоски, снижается биомасса корней. Указанные изменения приводят к снижению поглощения питательных веществ и воды, что отрицательно отражается на росте и развитии растения, а при высоких концентрациях тяжелых металлов может даже вызвать его гибель.

Токсичное действие металлов проявляется также в угнетении роста надземной части растений, хотя и в меньшей степени, чем корней. Уменьшаются высота побега и его биомасса, размеры соцветий и биомасса плодов, снижается количество образовавшихся семян, а в некоторых случаях растение полностью теряет способность к формированию органов генеративной сферы.

Отдельно необходимо отметить действие тяжелых металлов на рост листьев, поскольку лист является основным специализированным органом фотосинтеза. Повышение концентрации токсичных ионов в окружающей среде приводит к значительному уменьшению длины, ширины и площади листовых пластинок. Определенные изменения в присутствии тяжелых металлов наблюдаются и в анатомической структуре листа: уменьшаются число и размеры устьиц, клетки мезофилла листа приобретают неправильную форму, уменьшается их высота и площадь,

снижаются размеры хлоропластов и толщина клеточной стенки. Все отмеченные нарушения могут являться причиной снижения скорости и продуктивности процесса фотосинтеза.

### 3.2. Развитие

Влияние тяжелых металлов на развитие растений изучено в гораздо меньшей степени, чем их воздействие на рост. Обнаружено, что под влиянием высоких доз металлов увеличивается продолжительность отдельных этапов и онтогенеза в целом, а иногда растение вообще не переходит к генеративному развитию. Наблюдается также отставание в сроках наступления тех или иных фенологических фаз. С помощью морфофизиологического метода исследования, разработанного Ф. М. Куперман (1968) на основе изучения органообразовательных процессов в апикальных меристемах стебля, у растений однолетних злаков выявлено замедление органогенеза в присутствии ряда тяжелых металлов (Cd, Pb), что, очевидно, связано с торможением деления клеток апекса побега. Нельзя исключить также, что задержка развития может быть обусловлена изменением клеточного метаболизма в верхушечных меристемах, а также нарушениями в водном обмене, минеральном питании и фотосинтезе растений.

### 3.3. Фотосинтез

Фотосинтетический аппарат (ФСА) растений и сам процесс фотосинтеза очень чувствительны к повышению содержания тяжелых металлов в окружающей среде, что проявляется в нарушении многих параметров функционирования ФСА.

***Влияние тяжелых металлов на содержание фотосинтетических пигментов.*** Снижение интенсивности фотосинтеза у растений в присутствии тяжелых металлов связано в первую очередь с их негативным влиянием на фотосинтетические пигменты. В присутствии высоких концентраций целого ряда тяжелых металлов (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn и др.) обнаружено снижение содержания хлорофиллов "a" и "b". При этом на листьях

растений наблюдаются хорошо выраженные хлорозы. Главной причиной снижения содержания зеленых пигментов в присутствии тяжелых металлов является подавление биосинтеза хлорофилла, что прежде всего связано с непосредственным действием металлов на активность ферментов биосинтеза, в частности, протохлорофиллидоксиоредуктазы и хлорофиллсинтазы. В свою очередь, нарушение биосинтеза хлорофилла в присутствии Cd, Cu, Ni, Pb и Zn может быть вызвано вытеснением этими ионами иона  $Mg^{2+}$  из молекулы хлорофилла. Есть сведения, что уменьшение содержания зеленых пигментов в условиях повышенного содержания тяжелых металлов может быть также вызвано активизацией процесса деградации хлорофилла. Опосредованное действие металлов на биосинтез хлорофилла связано с вызванным ими дефицитом железа.

Каротиноиды менее подвержены негативному действию тяжелых металлов по сравнению с хлорофиллами. Поскольку каротиноиды участвуют в повышении устойчивости растений к различным стрессорам, предполагается, что сохранение их содержания на постоянном уровне при действии тяжелых металлов связано с выполняемой ими защитной ролью.

В целом, степень негативного влияния тяжелых металлов на содержание пигментов зависит от токсичности металла, его концентрации, длительности воздействия, а также от вида (сорта, генотипа) растения, фазы его развития и яруса листа.

***Влияние тяжелых металлов на ультраструктуру хлоропластов.*** Нарушения ультраструктуры хлоропластов в присутствии тяжелых металлов также являются одной из важных причин снижения содержания пигментов у растений и в целом уменьшения интенсивности фотосинтеза. В частности, при действии кадмия изменяется структура внешней мембраны хлоропластов, а также мембран тилакоидов, что может быть результатом гидролиза липидов и освобождения жирных кислот. При действии Cu и Ni в высоких концентрациях у растений увеличивается количество пластоглобул, что говорит об усилении деградации органелл. Кроме того, в присутствии тяжелых металлов уменьшается количество гран и нарушается их структура. Граны приобретают неправильную форму и содержат меньшее

количество тилакоидов. Отмеченные нарушения в структуре хлоропластов приводят к снижению содержания хлорофиллов в листьях растений, а также вызывают инактивацию кислородо-выделяющих центров ФС II и замедление электронного транспорта.

**Влияние тяжелых металлов на световую фазу фотосинтеза.** Тяжелые металлы оказывают сильное негативное действие на световые реакции фотосинтеза. Наиболее чувствительна к ионам металлов ФС II, активность которой оценивается на основании анализа кинетики замедленной флуоресценции хлорофилла. Изменения в присутствии тяжелых металлов таких параметров как максимальный ( $F_m$ ) и минимальный ( $F_0$ ) выход флуоресценции, переменная флуоресценция ( $F_v$ ), квантовая эффективность ФС II ( $F_v/F_m$ ), скорость электронного транспорта (ETR) указывают на определенные нарушения в деятельности ФСА растений. Однако доказано, что только высокие концентрации тяжелых металлов вызывают значительные изменения указанных параметров. Отмечается также некоторое снижение фотохимического тушения ( $qP$ ) и одновременно повышение уровня нефотохимического тушения ( $qN$ ).

Наиболее важными причинами снижения активности ФС II в присутствии повышенных концентраций тяжелых металлов являются изменение структуры белков реакционного центра, а также взаимодействие ионов некоторых металлов ( $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) с ионом  $Mn^{2+}$ , входящим в состав марганцевого кластера системы окисления воды ФС II. Имеются сведения и о повреждении тяжелыми металлами светособирающих антенных комплексов реакционных центров ФС I и ФС II. В целом ФС I считается относительно устойчивой к их действию, однако, некоторые нарушения обнаружены и здесь. В частности, работа ФС I подавляется медью, что обусловлено взаимодействием металла с ферредоксином.

Тяжелые металлы непосредственно влияют и на перенос электронов в фотохимических реакциях. Так, кадмий снижает скорость электронного транспорта на мембране тилакоидов, ингибирует транспорт электронов и протонов на уровне пластохинона при переходе электронов от ФС II к ФС I. Возможной

причиной ингибирования тяжелыми металлами фотосинтетического электронного транспорта являются изменения в ультраструктуре хлоропластов, в частности, повреждение тилакоидов. Помимо этого в присутствии тяжелых металлов у растений замедляется циклическое и нециклическое фотофосфорилирование, подавляется синтез АТФ. В целом воздействие тяжелых металлов на световую фазу фотосинтеза можно отразить следующей схемой (рис. 7).

***Влияние тяжелых металлов на темновую фазу фотосинтеза.*** Ионы тяжелых металлов вызывают серьезные нарушения и в реакциях темновой фазы фотосинтеза. При этом основными «мишенями» их токсического действия служат ферменты цикла Кальвина. В частности, кадмий инактивирует основной фермент темновой фазы – рибулозобисфосфаткарбоксилазу/оксигеназу (РБФК/О). Снижение активности фермента может быть вызвано нарушением его четвертичной структуры в результате взаимодействия тяжелых металлов с SH-группами. Кроме того, такие металлы, как Cd и Zn, уменьшают активность РБФК/О, заменяя  $Mg^{2+}$  в молекуле фермента.

Нельзя не отметить, что существуют и косвенные причины замедления скорости протекания реакций темновой фазы фотосинтеза в присутствии тяжелых металлов. Они связаны, например, со снижением поступления в клетки  $CO_2$  из-за уменьшения числа устьиц или их закрывания.

Таким образом, тяжелые металлы могут воздействовать на фотосинтез, уменьшая содержание фотосинтетических пигментов и активность ферментов цикла Кальвина, нарушая ультраструктуру хлоропластов, а также замедляя скорость электронного транспорта или поступления в клетки  $CO_2$ . Степень ингибирования фотосинтеза во многом зависит от концентрации металла в окружающей среде. Высокие концентрации металлов снижают интенсивность процесса ассимиляции  $CO_2$  как за счет прямого действия их ионов на отдельные реакции фотосинтеза, так и в результате опосредованного влияния на другие физиологические процессы (дыхание, водный обмен и минеральное питание).

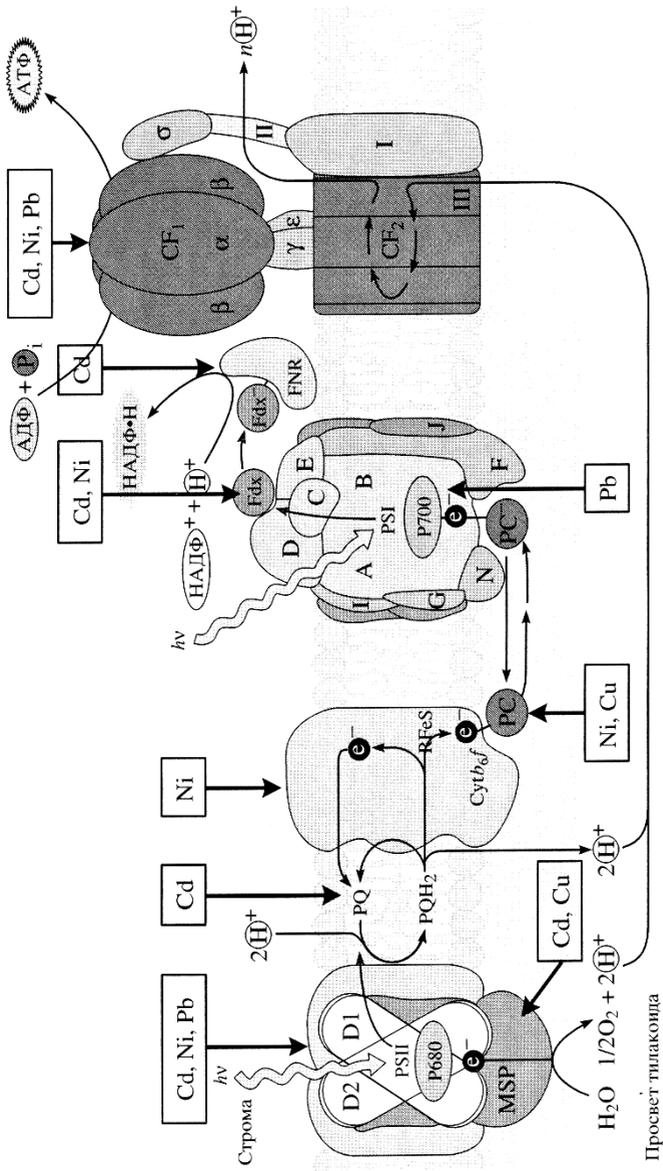


Рис. 7. Влияние тяжелых металлов на световые реакции фотосинтеза (Серегин, Кожевникова, 2006).

MSP – система фотолитиза воды; P680 – реакционный центр ФС II (PS II); D1 и D2 – белки ФС II; PQ и PQH<sub>2</sub> – пул пластохинона; RFeS – Fe-содержащие белки; PC – пластоцианин; P700 – реакционный центр ФС I (PSI); A-N – белки ФС I; Fd<sub>x</sub> – ферредоксин; FNR – ферредоксин-NADP<sup>+</sup>-оксидоредуктаза; CF<sub>1</sub> и CF<sub>2</sub> – частицы АТФазы. Стрелками показаны пути транспорта электронов и протонов

### 3.4. Дыхание

Дыхание – более устойчивый к повышенному содержанию тяжелых металлов процесс, чем фотосинтез. В довольно широком диапазоне концентраций металлы не вызывают у растений каких-либо изменений в его интенсивности. Более того, повышение их содержания в окружающей среде даже может приводить к некоторому возрастанию скорости этого процесса. Основными причинами усиления интенсивности дыхания под влиянием тяжелых металлов являются активация дыхательных ферментов, увеличение энергетических затрат организма на процессы поддержания и репарации повреждений в клетках, а также необходимость увеличения синтеза органических кислот (малата, цитрата, сукцината), которые выполняют роль хелаторов тяжелых металлов. Считается, что увеличение скорости дыхания в присутствии металлов является своеобразным компенсаторным механизмом, обеспечивающим накопление АТФ в митохондриях, когда происходит подавление синтеза АТФ в хлоропластах.

Концентрации тяжелых металлов, близкие к пороговым, наоборот, снижают интенсивность дыхания, оказывая отрицательное влияние на все этапы этого процесса. В этом случае замедление скорости дыхания в первую очередь связано с изменением активности ферментов гликолиза (например, гексокиназы), цикла Кребса (малатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы) и пентозофосфатного пути (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы). Установлено, что снижение активности ферментов вызвано изменениями в их структуре в связи с непосредственным взаимодействием ионов металлов с SH-группами молекул белков, а также с замедлением синтеза этих белков.

Торможение скорости дыхания растений в присутствии очень высоких концентраций тяжелых металлов может быть связано с ингибированием этими металлами транспорта электронов и протонов в митохондриях, в результате чего нарушается нормальное функционирование электрон-транспортной цепи. Наблюдается также разобщение окислительного фосфорилирования за счет увеличения пассивной проницаемости внутренней мембраны митохондрий для протонов.

Помимо этого такие металлы как Cd, Cu, Ni, Pb и Zn вызывают уменьшение скорости дыхания из-за нарушений целостности мембран митохондрий.

В целом, влияние тяжелых металлов на дыхание в большой степени зависит от силы воздействия: умеренный стресс, вызванный повышением содержания тяжелых металлов в корнеобитаемой среде, как правило, не сказывается на интенсивности дыхания растений или даже увеличивает ее, тогда как высокие концентрации заметно снижают скорость этого процесса. В случае, когда концентрация металла превышает порог устойчивости, дыхание нарушается, что может даже приводить к гибели растений. В основе отрицательного действия тяжелых металлов на дыхание растений прежде всего лежат изменения в активности ферментов.

### 3.5. Водный обмен

Нарушение водного обмена, наблюдаемое в присутствии высоких концентраций тяжелых металлов, отрицательно сказывается на большинстве физиологических процессов у растений (прорастании семян, росте и развитии, фотосинтезе и дыхании, ферментативной активности и т. д.). При повышении содержания тяжелых металлов в окружающей среде заметно снижается *относительное содержание воды* в клетках, что в первую очередь связано с уменьшением числа и диаметра сосудов ксилемы и ситовидных трубок флоэмы. При очень высоких концентрациях металлов по указанной причине может происходить настолько сильное ограничение поступления воды, что наблюдается гибель растений. Обезвоживание растительных тканей в условиях повышенного содержания тяжелых металлов может быть связано также со снижением эластичности клеточных стенок сосудов, которое обусловлено частичным замещением ионов кальция ионами тяжелых металлов и изменением проницаемости мембран. Кроме того, задержка роста корневой системы и уменьшение числа корневых волосков приводит к уменьшению всасывающей поверхности корня и, как следствие, к снижению содержания воды в клетках растений.

Как известно, водный баланс целого растения определяется соотношением интенсивности процессов поглощения воды и *транспирации*. При воздействии тяжелых металлов на растения наблюдается значительное снижение уровня транспирации, что прежде всего является результатом закрытия устьиц, которое в присутствии токсичных ионов связано с резким повышением уровня АБК в замыкающих клетках и утечкой ионов калия. Помимо непосредственного воздействия тяжелых металлов на устьица, замедление транспирации может быть связано с уменьшением размеров листьев и корневой системы, а также с нарушением поступления в замыкающие клетки ионов  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  вследствие изменений в минеральном питании растений.

В целом, тяжелые металлы в высоких концентрациях оказывают ярко выраженное негативное воздействие на водный обмен растений. Это связано как с непосредственным их влиянием на эластичность клеточных стенок, размеры устьиц, число и диаметр сосудов проводящей системы, так и с их опосредованным действием. В результате нарушения водообмена листья растений теряют тургор, что отрицательно сказывается на всех физиологических процессах. В обобщенном виде влияние тяжелых металлов на некоторые показатели, связанные с водным обменом растений, представлено в табл. 3.

Таблица 3

**Воздействие тяжелых металлов на некоторые показатели, оказывающие влияние на водный баланс растений**  
(по: Barcelo, Poschenrieder, 1990)

Уменьшаются в присутствии металлов	Увеличиваются в присутствии металлов	Могут варьировать или не определено
<b>Наземные органы</b>		
Количество и размеры листьев Размеры устьиц Скорость открытия/ закрытия устьиц Способность к осморегуляции Степень растяжения клеток	Количество устьиц Движения листьев Скорость отмирания кончика листа Старение и опадание листьев Вязкость ксилемы	Количество воска в кутикуле Покой и способность к регуляции скорости роста Водный потенциал листа

Уменьшаются в присутствии металлов	Увеличиваются в присутствии металлов	Могут варьировать или не определено
Эластичность клеточных стенок (Cd, Pb) Число и диаметр сосудов ксилемы		
Формирование боковых корней и корневых волосков Пространственное распределение корневой системы Скорость роста растяжением Способность к осморегуляции Водопроницаемость Контакт в системе корень-почва Отношение размеров корень/стебель Число и размеры элементов ксилемы	<b>Подземные органы</b>	
	Степень суберинизации корня	Интенсивность ионного транспорта
	Степень лигнификации	Водный потенциал
	Скорость отмирания кончика корня	

### 3.6. Минеральное питание

Одним из главных условий нормального роста и развития растений является сбалансированность химического состава клеток. При повышении в окружающей среде содержания тяжелых металлов, в том числе необходимых для растения, внутриклеточная концентрация элементов может существенно меняться, поскольку тяжелые металлы ингибируют поступление одних элементов и служат причиной повышения уровня других. Взаимоотношения между тяжелыми металлами и другими элементами минерального питания оказывают большое влияние на фотосинтез, содержание фотосинтетических пигментов, водный и гормональный баланс растений, активность ферментов. Более того, некоторые авторы считают, что типичные симптомы токсичности, вызываемые тяже-

лыми металлами (задержка роста и развития, хлороз листьев), являются вторичными эффектами, связанными с дефицитом элементов минерального питания.

Установлено, что между тяжелыми металлами и другими химическими элементами возможны аддитивные, антагонистические и синергические взаимодействия.

В случаях *аддитивных* взаимодействий физиологический эффект комплексного действия двух ионов равен сумме эффектов отдельных металлов (например, Cu – Co).

*Антагонизм* – это такой тип взаимодействия, при котором физиологический эффект совместного действия двух ионов (или молекул) на растения меньше, чем эффект от действия каждого из них в отдельности.

*Синергизм* – взаимное усиление физиологического действия на растение каждого из элементов. В результате физиологический эффект совместного действия ионов превышает сумму эффектов действия отдельных элементов.

Возможные варианты антагонистического и синергического взаимодействия между макроэлементами и тяжелыми металлами представлены в табл. 4.

Таблица 4

**Взаимодействие между элементами минерального питания и тяжелыми металлами в растениях**  
(по: Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989)

Элемент минерального питания	Характер взаимодействия	
	антагонизм	синергизм
N	Cu, Pb	–
P	Cd, Cu, Pb	Zn
K	Cd, Pb	–
Ca	Cd, Cu, Pb, Zn	Cu, Zn
Fe	Zn	–
Mg	Zn, Cu	–

Взаимный антагонизм выявлен также для следующих тяжелых металлов:

антагонисты Pb: Mn, Mg, Ca;

антагонисты Zn: Mn, Mg, Cd, Mo, Fe;

антагонисты Mn: Ni, Pb, Cd, Cu, Mn, Fe.

Взаимный синергизм установлен для следующих пар элементов:

Cu и Mo, Co, Cd, Mn, Zn;

Pb и Cd, Fe;

Mo и V, Fe, Mn.

Таким образом, тяжелые металлы могут вызывать дефицит элементов минерального питания, а также их дисбаланс. В свою очередь, дефицит элементов минерального питания, обусловленный тяжелыми металлами, может иметь серьезные негативные последствия, приводящие к нарушениям многих физиологических процессов.

### **3.7. Формирование продуктивности**

Токсическое действие тяжелых металлов на растения проявляется, как уже было сказано выше, в замедлении роста и развития растений, и соответственно снижении накопления ими биомассы надземных и подземных органов. При этом накопление биомассы выступает как интегральный процесс, отражающий итог всех функциональных и метаболических изменений в растении. Как правило, высокие концентрации тяжелых металлов приводят к уменьшению накопления биомассы корня и побега у многих видов растений. При этом наблюдается изменение их соотношения: с повышением концентрации токсичных ионов во внешней среде увеличивается отношение биомассы побега к биомассе корня, что связано с бóльшим угнетением роста корня.

Вопрос о влиянии тяжелых металлов на продуктивность семян или плодов изучен в настоящее время не столь полно. Тем не менее известно, что в присутствии повышенных концентраций Cd, Pb и Zn в почве у культурных злаков и бобовых снижается урожай семян. При этом отрицательное влияние тяжелых металлов на урожай семян складывается из их действия на отдельные структурные элементы урожая. Так, с повышением концентрации кадмия в субстрате у ярового ячменя уменьшается размер и биомасса колоса, а также количество колосков в колосе, что негативно сказывается на семенной продуктивности растений (табл. 5).

Таблица 5

**Влияние кадмия на элементы потенциальной семенной продуктивности растений ячменя (Титов и др., 2007)**

Концентрация ацетата кадмия, мг/кг субстрата	Длина колоса, см	Число колосков, шт	Биомасса колоса, г
0	3,2 ± 0,1	17,2 ± 0,8	0,30 ± 0,02
200	3,2 ± 0,1	16,2 ± 1,6	0,29 ± 0,02
400	2,9 ± 0,1	14,0 ± 0,8*	0,19 ± 0,03*
600	2,1 ± 0,2*	11,6 ± 0,6*	0,12 ± 0,02*

Примечание. \*Различия с контролем достоверны при  $P \leq 0,05$ .

Следует также отметить, что высокие концентрации тяжелых металлов в почве не только снижают накопление надземной биомассы и урожай семян культурных растений, но и ухудшают качество урожая, уменьшая количество важных питательных элементов, незаменимых аминокислот, витаминов. Кроме того, поступая в растения и накапливаясь в больших количествах в органах, которые используются в пищу животными и человеком, они создают потенциальный риск для их здоровья.

## ГЛАВА 4

### **МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

Устойчивость растений к тяжелым металлам принято рассматривать как способность переносить их действие в повышенных, токсичных концентрациях. В ответ на возрастание уровня тяжелых металлов в окружающей среде в растениях реализуется несколько различных защитно-приспособительных программ, направленных на их адаптацию и выживание. Принципиально устойчивость растений к тяжелым металлам может достигаться двумя основными путями:

- 1) предотвращением (ограничением) проникновения тяжелых металлов в клетку, в результате чего растение избегает их токсического действия на внутриклеточные процессы;
- 2) запуском внутриклеточных механизмов устойчивости.

Способность растительных организмов адаптироваться к воздействию тяжелых металлов без нарушения физиологических функций связана с определенными изменениями, происходящими на разных уровнях организации: молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном. Наиболее изученными являются клеточные и молекулярные механизмы металлоустойчивости.

#### **4.1. Клеточные и молекулярные механизмы**

В процессе эволюции у растений выработался целый ряд приспособительных механизмов, защищающих их клетки и внутриклеточные структуры от присутствующих в окружающей среде тяжелых металлов. К ним относятся: уменьшение поступления металлов в клетку, активация систем их выведения, изоляция в метаболически малоактивных соединениях и компартментах,

изменения метаболизма, направленные на снижение токсического действия металлов или ликвидацию его последствий (рис. 8). Указанные механизмы соответствуют двум стратегиям выживания организмов при стрессовых воздействиях: не допустить действие фактора (накопления тяжелого металла в клетке) или обезвредить его.

***Предотвращение проникновения тяжелых металлов в клетку.*** Многие растения, в первую очередь, «исключатели», способны предотвращать (ограничивать) накопление тяжелых металлов в клетках растений. Это достигается иммобилизацией ионов металлов в клеточной стенке и торможением транспорта ионов через плазмалемму.

Первым барьером на пути поступления тяжелых металлов в клетку выступает *клеточная стенка*. Связывание ионов тяжелых металлов клеточными стенками корня позволяет снизить их проникновение из почвенного раствора в цитоплазму. Иммобилизация в клеточной стенке ионов тяжелых металлов является одним из важнейших процессов, влияющих на устойчивость растений к их избытку в окружающей среде. При этом выделяют два типа иммобилизации: а) накопление ионов металлов в свободном пространстве и б) связывание металлов специфическими участками клеточной стенки. Считается, что образование комплекса с пектинами клеточной стенки является одним из основных механизмов, препятствующих поступлению ионов кадмия, свинца, цинка и никеля в цитоплазму клеток корней. Кроме того, отмечают возможность аккумуляции металлов в клеточных стенках у некоторых видов растений за счет связывания с белками и силикатами. Ионы тяжелых металлов могут не только адсорбироваться клеточной стенкой, но и накапливаться в ней или осадиться на ее поверхности в виде гранул.

Следует, однако, отметить, что связывание ионов тяжелых металлов клеточной стенкой не всегда обеспечивает необходимый уровень устойчивости. В частности, в случае действия на растения высоких концентраций тяжелых металлов клеточная стенка может достигать своеобразного «насыщения», ее барьерные функции при этом теряются, и она оказывается уже не способной защищать клетку от токсического действия металлов.

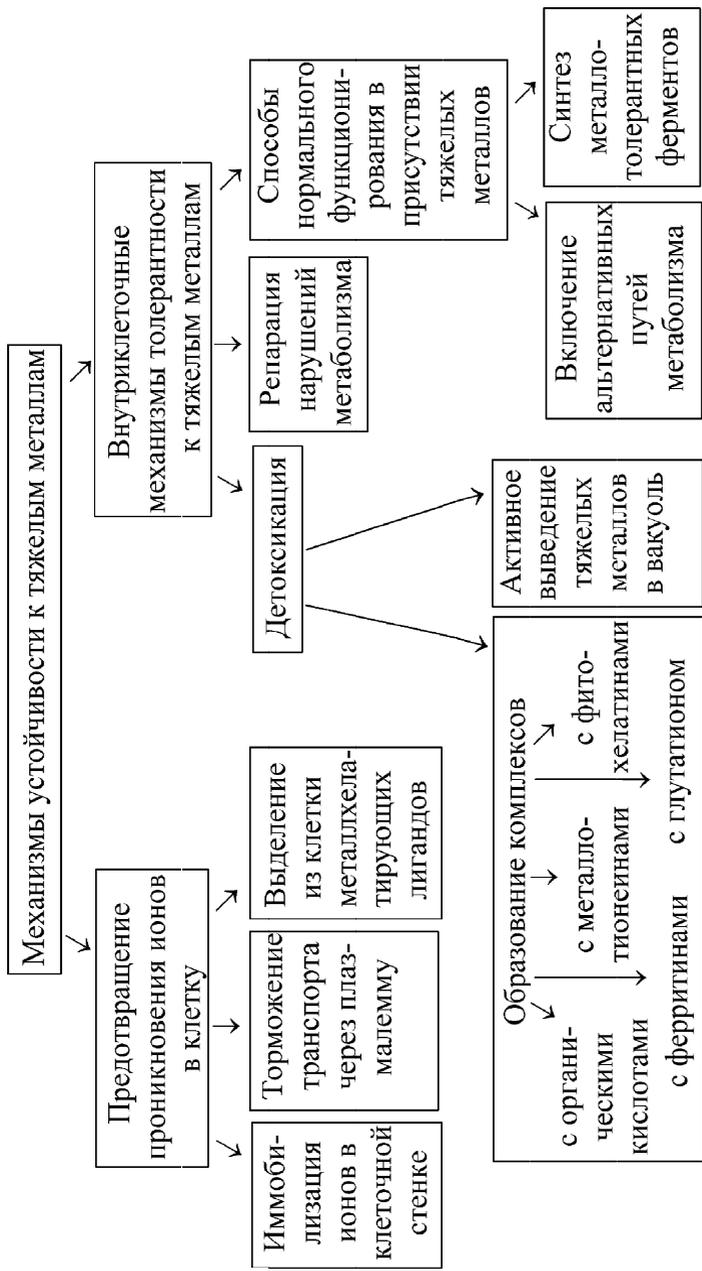


Рис. 8. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам (по: Чиркова, 2002)

**Торможение транспорта тяжелых металлов через плазмалемму.** Наряду с клеточной стенкой важную роль в устойчивости растений к тяжелым металлам играет плазмалемма. С одной стороны, она выступает в качестве мишени для токсического действия тяжелых металлов, а с другой стороны – в качестве барьера на пути их поступления в протопласт. Плазмалемма может полностью блокировать поступление токсичных ионов в клетку или снижать уровень их пассивного трансмембранного транспорта. Кроме того, поскольку плазматическая мембрана обеспечивает поддержание ионного баланса между клеткой и окружающей средой, то изменения в функционировании ее транспортных систем оказывают существенное влияние на ионный и энергетический обмен клетки, что отражается на устойчивости. Не менее важным механизмом повышения устойчивости растений к тяжелым металлам, связанным с работой плазмалеммы, является уменьшение доступных для реагирования с ионами металлов SH-групп на ее наружной стороне при одновременном увеличении их числа внутри клетки.

Хотя нет прямых доказательств участия транспортных белков плазматической мембраны в повышении устойчивости растений к тяжелым металлам, в последние годы высказано предположение, что они также могут играть важную роль в этих процессах. В частности, наиболее вероятными кандидатами для участия в механизмах устойчивости считают транспортные АТФазы, Са-каналы, катион/ $H^+$  антипорты, АВС-транспортёры, белки-транспортёры металлов CDF, Ntamps, ZIP, LCT1 и другие переносчики (рис. 9).

**Активное выведение тяжелых металлов из клетки.** Альтернативная стратегия снижения внутриклеточной концентрации тяжелых металлов плазматической мембраной может заключаться в активном выбросе ионов металлов из клетки. Подобный механизм выведения ионов тяжелых металлов из клеток обнаружен у микроорганизмов. Например, у бактерий выброс из клетки тяжелых металлов (Cd, Co, Cu, Ni, Zn) с участием таких транспортёров как АТФаза, катион/ $H^+$  антипорты считают основным механизмом устойчивости. Однако прямых доказательств существования такого рода механизмов защиты от действия тяжелых металлов у растений не обнаружено.

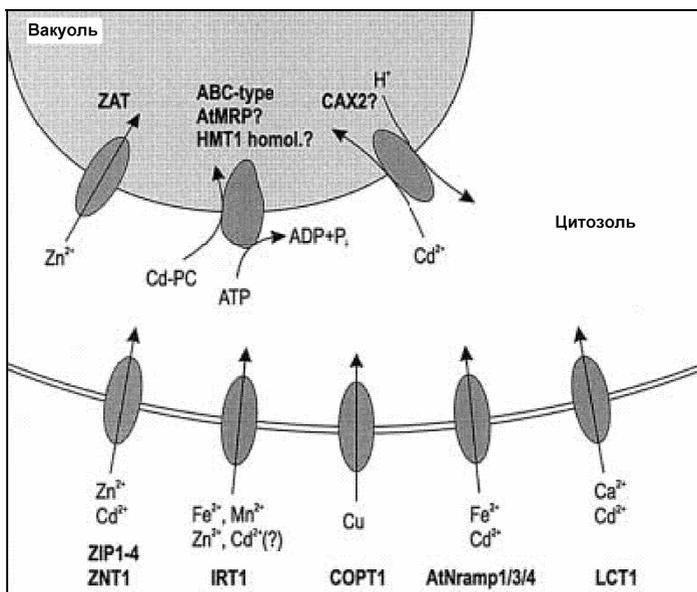


Рис. 9. Транспортеры металлов растений (по: Clemens, 2001)

**Выделение из клеток корней хелаторов** тяжелых металлов, таких как органические кислоты, аминокислоты, пептиды, фенолы и другие, приводит к связыванию тяжелых металлов и уменьшению их концентрации на наружной поверхности клеток корня, что снижает соответственно их поглощение растениями. Выделяемая клетками корня и покрывающая его поверхность слизь также ограничивает проникновение кадмия в клетки, т. е. выполняет защитную функцию.

Помимо этого, механизмы предотвращения проникновения тяжелых металлов в клетки растений включают также **задержание металлов грибами микоризы** на поверхности корня.

При высоких уровнях загрязнения тяжелыми металлами механизмы, ограничивающие их поступление в растения, оказываются недостаточными, в результате металлы попадают в ткани и клетки. В этом случае включаются внутриклеточные механизмы устойчивости (рис. 10). Условно их можно разделить на:

- 1) механизмы детоксикации;



Рис. 10. Поступление тяжелых металлов в цитоплазму клеток растений и возможные пути их детоксикации (Серегин, Кожевникова, 2006)

АФК – активные формы кислорода; АФС – аденозин-5-фосфосульфат; Гли – глицин; Глу – глутаминовая кислота; ГС – глутатионсинтаза; ГЦС –  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтаза; ГSN – глутатион; КАТ – каталаза; МТ – металлотионеины; ПОД – пероксидаза; СОД – супероксиддисмутаза; ФМФ – фитометаллофора; ФХС – фитохелатинсинтаза; ФХ – фитохелатин; Цис – цистеин; ZIP, LCT1, STR1 – транспортеры металлов на плазматической мембране; TgMTP, HMT1 – транспортеры металлов на тонопласте. Знак (?) – предполагаемые процессы; знак (+) – активация; знак (-) – ингибирование

2) механизмы, позволяющие клетке нормально функционировать в присутствии тяжелых металлов;

3) механизмы репарации повреждений, вызванных тяжелыми металлами.

К первой группе механизмов относят образование физиологически неактивных форм металлов – органических комплексов или нерастворимых неорганических соединений.

**Образование комплексов тяжелых металлов с различными лигандами.** Важным механизмом детоксикации тяжелых металлов в цитоплазме является их хелатирование – образование хелатов (комплексных соединений органических веществ с металлами). **Лигандами** (соединениями, образующими с металлом хелат) могут выступать органические кислоты, аминокислоты, фитохелатины и металлотионеины. В некоторых случаях происходит последующая компартментация комплекса лиганда с металлом в вакуоль.

**Органические кислоты.** Некоторые органические кислоты (лимонная, яблочная, щавелевая) способны образовывать прочные связи с ионами тяжелых металлов. К примеру, лимонная кислота образует комплексы с ионами Cd, Ni и Zn, а яблочная – с Zn. Причем лимонная, яблочная и щавелевая кислоты вовлечены не только в обезвреживание тяжелых металлов в цитоплазме, но и в процессы их транспорта в вакуоль. Хелатирование тяжелых металлов этими органическими кислотами в цитоплазме снижает их токсическое действие на метаболические процессы. Вместе с тем, четких корреляций между концентрацией органических кислот в растениях и уровнем их устойчивости к действию тяжелых металлов не установлено.

**Аминокислоты.** При поступлении некоторых тяжелых металлов в цитоплазму возможна их детоксикация за счет образования комплексов с аминокислотами, в первую очередь, с *гистидином*. Например, при действии никеля у гипераккумулятора *Alyssum murate* происходит значительное увеличение содержания гистидина и никеля в побеге и ксилемном соке. В то же время у *Alyssum montanum*, не способного к накоплению этого металла, количество этой аминокислоты не изменяется.

Помимо гистидина, хелаты с некоторыми тяжелыми металлами (Fe, Ni) способна образовывать и непротеиногенная аминокислота *никотинамин*.

**Металлотионеины.** Попадая в клетки растения, часть ионов металлов связывается специфическими белками, названными металлотионеинами. Металлотионеины представляют собой низкомолекулярные белки (8–10 кД), в составе которых около 30 % приходится на серосодержащую аминокислоту цистеин. Механизм их действия заключается в связывании ионов тяжелых металлов сульфгидрильными группами цистеина.

Впервые металлотионеины были обнаружены у животных, впоследствии их выделили из растений и прокариот. Поиск аналогии между металлосвязывающими белками растений и животных выявил у них различия в расположении остатков цистеина, вследствие чего металлотионеины разделяют на три класса. Металлотионеины класса I идентифицированы в основном в клетках животных, а металлотионеины растений, дрожжей, цианобактерий и некоторых грибов сгруппированы в класс II. Металлотионеины класса III обнаружены только у растений. Все металлотионеины являются генными продуктами и синтезируются на рибосомах.

Активное изучение металлотионеинов у растений начали проводить в 80-х годах прошлого века после их выделения из растений пшеницы, подвергнутых воздействию цинка. В настоящее время открыто более 50 металлотионеинов. Они индуцируются различными металлами, включая Cu, Cd, Hg, Pb, Zn.

Как установлено, в ответ на повышение концентрации тяжелых металлов в окружающей среде в растениях может синтезироваться довольно большое количество металлотионеинов, что позволяет связывать до 60–100 % металла.

В последние годы начато изучение экспрессии генов, ответственных за синтез металлотионеинов. Например, у *Arabidopsis thaliana* идентифицированы гены *MT1*, *MT2*, *MT3* и *MT4*, кодирующие металлотионеины, индуцируемые ионами меди. Гены *MT1a* и *MT2b* экспрессируются во флоэме листьев и корня, *MT2a* и *MT3* – в клетках мезофилла листьев, *MT4* – в семенах. Предполагается, что металлотионеины *MT1a* и *MT2b* участвуют в транспорте меди по флоэме, *MT2a* и *MT3* снижают избыток металла в мезофилле.

Необходимо отметить, что к настоящему времени экспериментально подтверждено функциональное значение металлотионеинов лишь в отношении устойчивости растений к ионам меди.

**Фитохелатины.** У высших растений обнаружено семейство низкомолекулярных пептидов – фитохелатинов, состоящих из линейных цепей остатков глутаминовой кислоты и цистеина и способных связывать тяжелые металлы через SH-группы.

Основная формула этих пептидов следующая:  $[\gamma\text{-Глу-Цис}]_n\text{-Гли}$ , где  $n = 2 - 11$ . У ряда видов растений С-терминальный глицин заменен на  $\beta$ -аланин (гомофитохелатины), серин (оксиметилфитохелатины), глутамат, глутамин или терминальная аминокислота вообще отсутствует. Фитохелатины с С-терминальными  $\beta$ -Ала, Глу и Сер относят к изофитохелатинам. Подобные полипептиды, обнаруженные в клетках дрожжевых грибов *Schizosaccharomyces pombe*, названы кадистинами. Отметим, что в ранних работах фитохелатины относили к классу III металлотионеинов.

В отличие от металлотионеинов, фитохелатины не являются генными продуктами и синтезируются из глутатиона с участием фермента фитохелатинсинтазы, находящейся в цитоплазме клетки. Предшественниками фитохелатинов также могут быть гомоглутатион, гидроксиметилглутатион и глутаминцистеин. Например, из оксиметилглутатиона синтезируются серин-фитохелатины у некоторых видов семейства *Poaceae*, в том числе у ячменя и овса.

Биосинтез фитохелатинов регулируется на уровне экспрессии генов, кодирующих фитохелатинсинтазу, а также генов, кодирующих ферменты синтеза глутатиона. Сравнительно недавно

были обнаружены гены фитохелатинсинтазы (PCS): *TaPCS1* у пшеницы, *AtPCS1* у *Arabidopsis thaliana*, *BjPCS1* у *Brassica juncea*. Глутатион синтезируется из глутамата, цистеина и глицина с участием АТФ-сульфорилазы,  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтазы (кодируемой геном *gsh1*) и глутатионсинтазы (кодируемой геном *gsh2*), идентифицированных у *Brassica juncea*. Повышение активности ферментов синтеза глутатиона коррелирует с усилением экспрессии соответствующих генов.

Синтез фитохелатинов индуцируется ионами различных тяжелых металлов. В частности, индукторам образования фитохелатинов могут выступать Ag, Au, Cd, Cu, Pb, Sb, Sn, Zn. Из них наиболее эффективны Cd и Cu, тогда как другие металлы оказывают меньшее действие. В отличие от этого, некоторые тяжелые металлы (Cr, Fe, Mo, Ni, V) не индуцируют образования фитохелатинов.

Роль фитохелатинов в растениях обсуждается многими авторами. В ранних работах было высказано мнение, что их функция состоит в поддержании клеточного гомеостаза и/или транспорте необходимых тяжелых металлов, таких как Cu или Zn. Позже было показано, что уровень этих металлов, необходимый для синтеза фитохелатинов, во много раз превышает их нормальное содержание в растении и близок к токсичным дозам. В настоящее время считается, что связывание ионов тяжелых металлов фитохелатинами является одним из наиболее важных механизмов их детоксикации. Например, образующиеся кадмий-фитохелатиновые комплексы в 10–1000 раз менее токсичны для чувствительных к металлам растительных ферментов, чем свободные ионы кадмия.

Считается, что повышение металлоустойчивости растений связано со сверхпродукцией фитохелатинов или быстрым синтезом длинных их цепей, образующих более стабильные комплексы по сравнению с короткими формами. Образование фитохелатинов происходит в цитоплазме. В то же время известно, что большая часть поступившего в клетку металла, например кадмия, находится в клеточной стенке и в вакуоли. На основании этого высказана гипотеза, что комплексы фитохелатинов с металлом активно транспортируются из цитоплазмы в вакуоль через тонопласт. Ввиду того,

что значение рН вакуолярного сока значительно ниже, чем цитоплазмы, комплексы фитохелатинов с кадмием диссоциируют, образуя свободные ионы  $Cd^{2+}$  и восстановленные фитохелатины. Ионы же кадмия связываются с органическими кислотами и аминокислотами, присутствующими в вакуолярном соке, и таким образом инактивируются. Пептиды подвергаются деградации вакуолярными протеазами и покидают вакуоль, выполняя роль транспортного механизма для переноса кадмия.

В последние годы гипотеза детоксикации кадмия фитохелатинами получила дальнейшее развитие. Считается, что, образуя в цитоплазме низкомолекулярный или средномолекулярный комплекс с фитохелатинами, кадмий транспортируется в вакуоль, где образуется высокомолекулярный комплекс, обеспечивающий его максимальную детоксикацию. При этом транспорт кадмия в вакуоль и его изоляция в виде физиологически неактивных комплексов играет важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза. Имеющиеся данные свидетельствуют о возможности поступления кадмий-фитохелатиновых комплексов в вакуоль дрожжевого гриба *Schizosaccharomyces pombe* с помощью АТФ-зависимого АБС-транспортера (НМТ1), находящегося на тонопласте. Однако пока участие НМТ1 в транспорте металлов у высших растений не доказано. Остается также неизвестным, происходит ли вторичное использование фитохелатинов, поступивших в вакуоль. Следовательно, фитохелатины скорее всего выполняют роль транспортной системы, выводя избыток металлов в вакуоль, где они изолируются в виде комплексов с органическими кислотами (малатом, оксалатом, цитратом).

Образование фитохелатинов является одной из важных составных частей программы ответа клетки на поступление тяжелых металлов в цитоплазму, а подавление синтеза фитохелатинов (искусственно или в результате мутации) ведет к гиперчувствительности, а в некоторых случаях и потере жизнеспособности.

**Глутатион.** Важную роль в детоксикации ионов ртути и серебра у растений играет глутатион – низкомолекулярный пептид с высоким содержанием серы, являющийся предшественником фитохелатинов, который и сам способен образовывать стабильные комплексы с металлами. Кроме того, глутатион, как один

из наиболее эффективных низкомолекулярных антиоксидантов, защищает растения от повреждающего действия активных форм кислорода, накапливающихся при действии тяжелых металлов.

**Ферритины.** Железосодержащие белки ферритины, позволяющие запасать значительное количество железа без ущерба для растения, способны связывать в клетке такие металлы, как Cd, Cu, Pb, Zn. Существует мнение, что ферритины первыми включаются в процесс хелатирования ионов металлов в клетке, а металлотионенины синтезируются во вторую очередь.

**Компартментация тяжелых металлов в вакуоли.** Важную роль в механизмах устойчивости растений к действию тяжелых металлов играет их компартментация и детоксикация. Ионы тяжелых металлов после связывания их с фитохелатинами в цитоплазме транспортируются в вакуоль. Кроме того, из цитоплазмы в вакуоль поступают свободные ионы металлов. Компартментация тяжелых металлов в вакуоли приводит к снижению их концентрации в цитоплазме. Имобилизация ионов металлов в вакуоли, так же как и в клеточной стенке, переводит их в неактивную форму. Преимущественное накопление тяжелых металлов в вакуоли обеспечивается локализацией в ней соединений, обладающих большим сродством к металлам (например, анионов органических кислот) и образующих с ними труднорастворимые комплексы.

Механизмы поступления металлов в вакуоль через тонопласт в последнее время активно изучаются. Имеющиеся данные свидетельствуют о возможности участия в транспорте тяжелых металлов через тонопласт различных систем: металл/ $H^+$  антипортов, а также транспортеров, которые переносят ионы металла (TgMTP) или комплексы металла с фитохелатинами (HMT1). Например, у гипераккумулятора *Thlaspi goesingense* выявлены гены транспортера TgMTP, активация которого позволяет накапливать в вакуоли до 75 % никеля, поступающего в симпласт. Кроме того, показано участие транспортеров ZAT и ZIF в устойчивости к цинку, а также SAH2 в устойчивости к кадмию. Высокий уровень экспрессии генов, кодирующих локализованные на тонопласте белки-транспортеры металлов в вакуоль, может быть определяющим фактором устойчивости растений к действию тяжелых металлов.

В целом, аккумуляция тяжелых металлов в вакуоли в виде труднорастворимых комплексов с органическими кислотами приводит к снижению их концентрации в цитоплазме и является универсальным и эффективным механизмом детоксикации.

**Изменения метаболизма в условиях действия тяжелых металлов.** Важным механизмом металлоустойчивости растений является *синтез устойчивых к тяжелым металлам ферментов* с измененной структурой, позволяющей им функционировать в таких условиях. Считается, что возможны такие изменения в последовательности аминокислот, которые не задевают активные центры ферментов, не изменяют их каталитических свойств и приводят к образованию ферментов, более устойчивых к инактивирующему воздействию тяжелых металлов. Например, установлено, что карбоангидраза из листьев неустойчивых популяций *Melica nutans* инактивируется в присутствии свинца, в то время как у устойчивой популяции, наоборот, активируется им. В листьях устойчивых растений этого вида присоединение свинца к отдаленному от активного центра участку молекулы фермента приводит к его модификации и повышению каталитической активности.

Исследования действия тяжелых металлов на ферменты, такие как карбоангидраза, кислая фосфатаза, нитратредуктаза, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, довольно многочисленны. Однако их результаты свидетельствуют о том, что закономерности, наблюдаемые в ранних работах *in vivo*, не всегда совпадают с теми, которые выявляются при изучении ферментов *in vitro*.

Особое место в защитных реакциях растений на действие тяжелых металлов принадлежит *антиоксидантным ферментам* (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы), активность которых значительно возрастает в этих условиях. Это приводит к нейтрализации свободных радикалов и пероксидов, образующихся под влиянием тяжелых металлов и оказывающих повреждающее действие на клетки, что способствует повышению устойчивости.

**Включение альтернативных путей метаболизма.** К наименее изученным механизмам металлоустойчивости растений

относится активация под влиянием тяжелых металлов альтернативных ингибированных путей метаболизма. Так, например, установлено, что при избытке цинка в среде выращивания происходит компенсаторное переключение потока электронов с основного цитохромного пути дыхания на альтернативный цианидрезистентный. Однако сведений о включении альтернативных путей метаболизма в условиях действия тяжелых металлов в литературе крайне мало, что не позволяет в настоящее время сделать определенное заключение относительно их роли в повышении устойчивости растений к тяжелым металлам.

#### ***Участие стрессовых белков в репарации повреждений.***

Токсичное действие тяжелых металлов на растения связано с образованием активных форм кислорода и денатурацией белков, что приводит к повреждению мембран и нарушению многих физиологических и биохимических процессов.

Активное участие в защите клетки от токсичного действия тяжелых металлов принимают так называемые белки теплового шока (БТШ), синтез которых индуцируется у многих видов растений. Так, в культуре клеток *Lycopersicon peruvianum* под влиянием соли кадмия синтезировался БТШ 70, который был локализован в плазмалемме, ядре, а также в мембранах митохондрий и эндоплазматического ретикулума. Кадмий также индуцировал синтез БТШ с молекулярными массами 70, 42, 40, 26, 23, 15 и 11 кД в корнях риса. Считается, что БТШ не только защищают белки плазмалеммы от токсического действия кадмия, но и способствуют процессам ее репарации в случае повреждения этим металлом.

К настоящему времени вопрос о том, какие конкретно гены контролируют устойчивость растений к тяжелым металлам, остается открытым, однако, считается, что их достаточно много. В частности, у растений *Arabidopsis thaliana* кадмий индуцировал экспрессию более 30 генов, включая гены, кодирующие протеинкиназы, транскрипционные факторы, кальмодулинсвязывающие белки, металлосвязывающие белки, ферменты синтеза глутатиона, шапероны, в том числе БТШ. В результате экспрессии генов, ответственных за биосинтез различных стрессовых белков, противодействующих токсическому влиянию тяжелых металлов, происходит повышение металлоустойчивости растительной клетки.

#### 4.2. Механизмы устойчивости, действующие на тканевом и организменном уровнях

В растении имеется несколько физиологических барьеров, которые препятствуют поступлению тяжелых металлов в клетки и таким образом обеспечивают их устойчивость. На клеточном уровне – это, как показано выше, прежде всего клеточная стенка и плазмалемма, которые ограничивают поступление металла в протопласт. **На тканевом уровне** – это эндодерма и оболочки клеток центрального цилиндра корня, препятствующие поступлению металла в сосудистую систему и, следовательно, его попаданию в надземные органы. Однако эти барьеры не универсальны. К примеру, Cd и Pb перемещаются через апопласт, и их поступление в центральный цилиндр ограничено, в отличие от никеля, который свободно проникает в него через симпласт. Та часть тяжелых металлов, которая проникает в лист, накапливается преимущественно в клетках эпидермиса. Это позволяет предотвращать нарушение физиологических процессов в клетках более функционально значимого для растений мезофилла.

Известно, что устойчивость растений во многом определяется устойчивостью их апикальных меристем и заключается в способности сохранять постоянный клеточный состав и поддерживать нормальные темпы клеточного деления. Осуществляется это за счет особой структурно-функциональной организации меристематических клеток. Способность этих клеток, имеющих при благоприятных условиях низкую пролиферативную активность и невысокий уровень метаболизма, к быстрому делению в условиях стресса во многом обеспечивает устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов среды.

**На организменном уровне** проявляются механизмы устойчивости, отражающие взаимодействие частей и органов в системе целого растения. К числу таких механизмов, определяющих устойчивость растений к действию тяжелых металлов, можно отнести (рис. 11):

- 1) задержку поглощения тяжелых металлов корнями;
- 2) способность растения регулировать их транспорт из корней в побег;

- 3) функционирование ряда барьеров (корень-стебель, стебель-соцветие) на пути транспорта металлов к наиболее важным для жизнедеятельности растений органам;
- 4) участие трихом в выведении тяжелых металлов из растения;
- 5) сбрасывание листьев, накопивших большое количество тяжелых металлов.

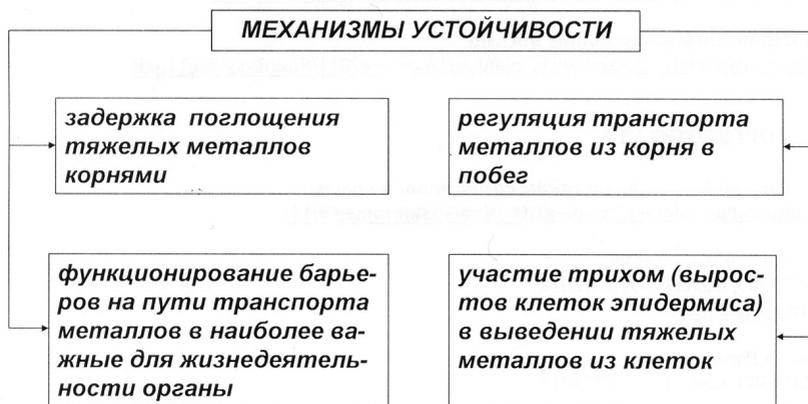


Рис. 11. Механизмы металлоустойчивости растений, действующие на организменном уровне

Наиболее изучены механизмы ограничения поглощения тяжелых металлов корнями растений, что характерно для многих устойчивых видов. В то же время, механизмы регуляции транспорта тяжелых металлов из корней в побег пока неизвестны. Высказано лишь предположение о возможном участии гистидина в дальнем транспорте никеля, основанное на многократном увеличении содержания этой аминокислоты в ксилемном соке в присутствии металла. Транспортёры металлов в ксилеме также еще не идентифицированы. В последние годы появляются факты, свидетельствующие о важной роли трихом в компартментации и детоксикации кадмия у растений *Brassica juncea*, цинка у *Arabidopsis halleri*. Однако конкретные механизмы накопления в них металлов пока не установлены.

Естественно, что все вышеуказанные процессы, включая снижение поглощения металлов клетками корня, скорости дальнего транспорта, поступления в клетки листьев и их аккумуляция в трихомах, могут оказывать влияние на устойчивость растений. Растения при этом должны сохранять необходимые для физиологических и биохимических процессов металлы и минимизировать эффекты токсичных металлов.

Различия в устойчивости разных видов (экотипов, сортов, генотипов) растений могут быть обусловлены несколькими механизмами, действующими на разных уровнях организации, в том числе:

- неодинаковой способностью к ограничению процессов поглощения тяжелых металлов;
- преобладающим связыванием тяжелых металлов в клеточной стенке и вакуоли у растений устойчивых популяций;
- различной скоростью транспорта тяжелых металлов из корней в побеги и концентрирование их в отдельных тканях корня;
- синтезом ферментов, устойчивых к тяжелым металлам;
- активизацией механизмов выведения ионов тяжелых металлов из клеток.

Поэтому одни устойчивые к тяжелым металлам виды растений, например «исключатели», используют механизмы ограничения поступления тяжелых металлов и механизмы выделения, что приводит к снижению поглощения и транспорта из корня в надземные органы. Другие устойчивые виды способны существовать с повышенным содержанием тяжелых металлов в тканях благодаря активному образованию металлосвязывающих веществ, клеточной и субклеточной компартментации или определенным изменениям метаболизма, компенсирующим негативные эффекты тяжелых металлов.

## ГЛАВА 5

### ГИПЕРАККУМУЛЯЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ РАСТЕНИЯМИ И ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ-ГИПЕРАККУМУЛЯТОРОВ ДЛЯ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ

Некоторые виды растений могут успешно расти на почвах с повышенным естественным уровнем содержания тяжелых металлов или загрязненных в результате хозяйственной деятельности человека и накапливать при этом значительное количество металлов в надземных органах. Так, в районах рудных месторождений описаны специфические флоры – галмейная, медная, никелевая, серпентиновая, свинцовая, полиметаллическая и другие, которые сформировались на почвах с высоким естественным обогащением тяжелыми металлами. Эти виды и генотипы растений обладают высоким уровнем устойчивости (гиперустойчивостью) к некоторым из тяжелых металлов.

Растения, составляющие металлофитные флоры, можно разделить на две группы:

**1. Металлофиты** – виды, которые обитают только на обогащенных тяжелыми металлами почвах в пределах определенного района. Некоторые металлофиты могут без признаков интоксикации аккумулировать значительно большее количество тяжелых металлов, чем обычные растения. Механизмы, используемые при гипераккумуляции, являются предметом дискуссий, тем не менее, существуют представления о том, что гипераккумуляции способствуют тиолсодержащие полипептиды, функционально сходные с металлотиионами. Своеобразной особенностью металлофитов является специфичность к металлу, воздействию которого подвергается популяция. Иногда у популяций отмечается устойчивость одновременно к двум и более металлам (сопутствующая, или множественная металлоустойчивость), которая, однако, ниже основной металлоустойчивости.

**2. Псевдометаллофиты** – обычные виды местной флоры, которые обитают на почвах с очень большим содержанием тяжелых металлов либо благодаря более высокой металлоустойчивости вида в целом, либо за счет образования металлоустойчивых популяций. В свою очередь, псевдометаллофиты разделяют на:

- а) избирательные – встречаются и даже более жизненны на обогащенных металлами почвах, по сравнению с обычными;
- б) индифферентные – встречаются регулярно на богатых металлами почвах, но их обилие, жизненность ниже, чем у тех же видов на обычных почвах;
- в) случайные металлофиты – рудеральные виды, спорадически появляющиеся и угнетенные на обогащенных почвах. Их адаптация к тяжелым металлам может происходить за счет формирования устойчивых популяций.

### **5.1. Гипераккумуляция тяжелых металлов растениями**

**Гипераккумуляция (сверхнакопление)** представляет собой одну из стратегий устойчивости растений к металлам, связанную со способностью концентрировать их в тканях надземных органов. Термин «гипераккумулятор» (сверхнакопитель) относится к растениям, способным накапливать тяжелые металлы в побегах до концентраций, в 100–1000 раз превышающих таковые у обычных растений. В табл. 6 представлены минимальные концентрации для ряда металлов, позволяющие относить растения к гипераккумуляторам. Сверхнакопление показано для As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Se, Zn. Примеры содержания тяжелых металлов в некоторых растениях-гипераккумуляторах, произрастающих на загрязненных почвах, показаны в табл. 7.

Число растений-сверхнакопителей ограничено, поэтому поиск видов растений, накапливающих избыток тяжелых металлов, привлекает внимание многих исследователей. К настоящему времени выявлено более 400 видов растений-гипераккумуляторов, относящихся к 45 семействам (табл. 8). Причем, среди них около 300 (почти 75 %) видов растений являются накопителями никеля и только 20–30 видов аккумулируют Co, Cu, Zn. Список расте-

ний-гипераккумуляторов цинка включает около 20 видов, представленных преимущественно растениями семейства *Brassicaceae* (Крестоцветные) (11 видов рода *Thlaspi* и 1 вид рода *Arabidopsis*), а также относящихся к другим семействам и родам (*Silene*, *Armeria*, *Viola*). Сверхнакопление Cd и Pb – еще более редкое явление среди высших растений. Например, о способности к накоплению кадмия указывалось только в отношении растений-гипераккумуляторов цинка – *Thlaspi caerulescens* и *Arabidopsis halleri* и гипераккумулятора никеля – *Thlaspi goesingense*. Среди растений-сверхнакопителей выявлены представители семейства *Brassicaceae*, которые накапливают свинец (*Thlaspi*). Причем, некоторые растения, в частности *Brassica juncea*, способны аккумулировать не один, а несколько тяжелых металлов – Cd, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, что имеет важное значение, поскольку загрязнение почв редко ограничивается одним металлом.

Таблица 6

**Минимальные концентрации различных металлов в надземных органах растений, позволяющие относить их к гипераккумуляторам (по: Brooks, 1998; \*Baker, Brooks, 1989)**

Накапливаемый металл	Содержание металла, мкг/г сухой массы
Cd, As	100
Co, Cu, Cr, Ni, Pb	1000
Mn, Zn*	10 000

Таблица 7

**Содержание тяжелых металлов в побегах некоторых видов растений-гипераккумуляторов (по: Baker, Walker, 1990; Yang et al., 2004)**

Металл	Вид растения	Концентрация металла, мг/кг сухой массы	ПДК для растений-исключателей, мг/кг сухой массы
Cd	<i>Thlaspi caerulescens</i>	1 800	0,03
	<i>Sedum alfredii</i>	6 500	
Pb	<i>Brassica juncea</i>	4 700	0,5
	<i>Thlaspi rotundifolium</i>	8 200	
Zn	<i>Arabidopsis halleri</i>	32 000	10
	<i>Thlaspi caerulescens</i>	20 000	

Доминирующие в накоплении и сверхаккумуляции семейства – *Brassicaceae*, *Asteraceae* (Сложноцветные), *Cyperaceae* (Осоковые), *Fabaceae*, *Poaceae*. Семейство *Brassicaceae* имеет самое большое число таксонов (11 родов и 87 видов), для которых установлена гипераккумуляция металлов. Однако большинство видов растений-гипераккумуляторов – сравнительно небольшие по размерам и медленно растут, что ограничивает возможности их использования для широкомасштабной очистки загрязненных почв.

Таблица 8

**Растения, способные к гипераккумуляции тяжелых металлов**  
(по: Петрунина, 1974; Прасад, 2003; Серегин, Кожевникова, 2006)

Род, вид	Накапливаемый металл
<i>Alyssum</i> (около 50 видов)	Ni
<i>Arabidopsis halleri</i>	Cd, Zn
<i>Armeria maritima</i>	Pb, Zn
<i>Armeria plantaginea</i>	Zn
<i>Brassica juncea</i>	Cd, Cu, Ni, Pb, Se, Zn
<i>Helianthus annuus</i>	Pb
<i>Leucocroton</i> (около 30 видов)	Ni
<i>Minuartia verna</i>	Ni, Zn
<i>Thlaspi</i> (более 20 видов)	Ni
<i>Thlaspi alpestre</i>	Zn
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Cd, Pb, Zn,
<i>Thlaspi calaminaria</i>	Zn
<i>Thlaspi capeaefolium</i>	Zn
<i>Thlaspi goesingense</i>	Cd, Ni
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	Pb
<i>Sedum alfredii</i>	Cd, Zn
<i>Silene vulgaris</i>	Zn
<i>Phyllanthus</i> (более 40 видов)	Ni
<i>Polycarpea glabra</i>	Pb, Zn
<i>Viola calaminaria</i>	Zn

Молекулярные механизмы, объясняющие гиперустойчивость, активно изучаются. К настоящему времени предложено несколько гипотез о механизмах гипераккумуляции тяжелых металлов. В соответствии с одной из них, гипераккумуляторы обладают наиболее эффективной системой поглощения ионов металлов. Согласно другой гипотезе гипераккумуляция связана

с повышенной способностью некоторых растений транспортировать поглощенный металл в компартменты с низкой физиологической активностью или в органы, из которых можно его удалить впоследствии, например, в старые листья. Третья гипотеза основана на том, что аккумуляция металла, в частности никеля, в тканях повышает устойчивость растений к дефициту влаги в результате снижения кутикулярной транспирации. Согласно «гипотезе аллелопатии», опадающие листья растений-гипераккумуляторов с высоким содержанием тяжелых металлов обогащают ими почву и ингибируют рост соседних растений, не устойчивых к данному металлу, таким образом освобождая пространство для первых. В соответствии с еще одной довольно распространенной гипотезой, сформировавшаяся в ходе эволюции гипераккумуляция Ni и Zn в покровных и проводящих тканях представляет собой защиту растений от травоядных животных и патогенов.

Большинство гипераккумуляторов характеризуется высокой естественной (эволюционно приобретенной) устойчивостью к металлу, который они накапливают. Генетически эта гиперустойчивость контролируется небольшим количеством генов. Однако у *Arabidopsis halleri* и *Thlaspi caerulescens* гипераккумуляция и устойчивость не коррелируют или между ними даже наблюдается обратная зависимость. Более того, показано, что у *Arabidopsis halleri* способность растений к аккумуляции кадмия и их устойчивость находятся под независимым генетическим контролем.

Одним из наиболее изученных гипераккумуляторов тяжелых металлов является *Thlaspi caerulescens*, который накапливает Cd, Ni и Zn. По физиологическим, морфологическим и генетическим характеристикам этот вид считается удобным модельным объектом для исследования процесса гипераккумуляции. Растения данного вида характеризуются повышенной способностью поглощать металлы из почвы, транспортировать их из корня в побег и накапливать в листьях. У них обнаружена высокая экспрессия гена *ZNT1* (zinc transporter 1), отвечающего за поступление Cd и Zn в клетку. Считается, что повышенная способность этого вида извлекать Cd и Zn из ризосферы объясняет его гипераккумуляцию, а способность накапливать их преимущественно в вакуолях эпидер-

миса является фактором гиперустойчивости, поскольку позволяет защищать клетки мезофилла от токсического влияния металла и сохранять их функциональную активность.

Накопление большого количества тяжелых металлов в тканях гипераккумуляторов требует высокоэффективных механизмов их детоксикации. Важную роль в процессах детоксикации играют различные хелаторы, основными из которых являются органические кислоты, аминокислоты, фитохелатины и металлотионеины. В частности, у гипераккумуляторов обычно отмечают высокое содержание малата и/или цитрата. Например, у всех гипераккумуляторов семейства *Brassicaceae* малат присутствует в довольно высоких концентрациях, достаточных для хелатирования большей части цинка, поступающего в листья. В то же время около 40 % цинка в листе связывается цитратом. В клетках органические кислоты в основном локализованы в вакуоли и соответственно там находятся их комплексы с цинком. Высказано предположение, что комплексы цитрата и малата с металлами могут также транспортироваться по ксилеме, хотя показано, что Cd, Ni, Zn в ксилеме присутствуют и в виде свободных ионов.

У растений *Thlaspi goesingense* никель также накапливается главным образом в виде комплекса с малатом или цитратом в вакуоли листа и клетках эпидермиса стебля. Этот гипераккумулятор в отличие от неаккумулирующего вида *Thlaspi arvense*, характеризуется высоким уровнем экспрессии гена *TgMTP1*, контролирующего синтез белка транспортера TgMTP1, участвующего в транспорте никеля в вакуоль.

В корнях и в меньшей степени в листьях гипераккумуляторов *Thlaspi caerulescens*, *Silene vulgaris*, *Holcus lanatus*, *Agrostis castellana* под влиянием кадмия происходит накопление фитохелатинов. Важную роль в гипераккумуляции цинка и особенно никеля у растений рода *Thlaspi* отводят аминокислоте гистидину, участвующему в дальнем транспорте металла по ксилеме. У растений гипераккумуляторов *Alyssum serpyllifolium*, *Alyssum bertolonii*, *Alyssum lesbiacum* никель также локализован главным образом в вакуоли в виде комплекса с малатом и цитратом, т. е. его детоксикация осуществляется в результате удаления в метаболически неактивный компартмент. И, следовательно, способ-

ность растений аккумулировать никель в вакуолях в качестве комплекса с органическими кислотами определяет их устойчивость к высокому уровню этого металла в среде.

Растения *Brassica juncea* отличаются от вышеназванных гипераккумуляторов большой биомассой и довольно быстрым накоплением Cd, Cu, Ni, Pb, Se, Zn. У них обнаружена сверхэкспрессия гена *gsh1*, кодирующего фермент  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазу, участвующего в синтезе предшественника фитохелатинов глутатиона. Следовательно, сверхустойчивость этого вида растений обусловлена образованием не только фитохелатинов, но и глутатиона, участвующего в детоксикации металла.

Таким образом, гипераккумуляция тяжелых металлов у растений обеспечивается разными механизмами: эффективностью адсорбции и поглощения ионов из почвы, устойчивостью транспортной системы растения к тяжелым металлам, повышенной металлосвязывающей способностью клеточных стенок, эффективностью механизмов детоксикации металлов и сохранения ионного гомеостаза. В побегах растений-сверхнакопителей детоксикация металлов достигается благодаря хелатированию металлов, внутриклеточной компартментации в вакуолях и апопласте или аккумуляцией в эпидермисе и трихомах листьев.

В целом, способность к гипераккумуляции тяжелых металлов у растений, очевидно, определяется механизмами поглощения и транспорта металлов, в то время как их устойчивость к избытку металла – механизмами их детоксикации.

## **5.2. Фиторемедиация почв, загрязненных тяжелыми металлами**

Гипераккумулирующие генотипы являются основой для **фиторемедиации** (от греческого “фитон” – растение и латинского “ремедиум” – восстанавливать) – современной технологии очистки загрязненных почв с использованием зеленых растений (рис. 12). Фиторемедиацию признали эффективным и экономически выгодным методом очистки почв после того, как была выявлена и изучена способность ряда растений накапливать в побегах в десятки-сотни раз больше тяжелых металлов по сравнению с другими растениями.

Растения, подходящие для целей фиторемедиации, должны обладать следующими свойствами:

- 1) способностью аккумулировать металл(ы) преимущественно в надземных органах;
- 2) устойчивостью к накапливаемому металлу;
- 3) быстрыми темпами роста и большой биомассой;
- 4) высокой способностью к отрастанию после скашивания.

При этом гипераккумуляция и металлоустойчивость являются наиболее важными свойствами растений, используемых для фиторемедиации.

Например, недавно был обнаружен сверхнакопитель Cd и Zn *Sedum alfredii*. При его выращивании в присутствии цинка (80 мг/л питательного раствора) концентрация металла в побегах составляет более 20 000 мг/кг сухой массы. Существенно, что растения *Sedum alfredii* не только являются гипераккумуляторами металлов в побегах, но и обладают биологическими характеристиками, важными для целей фиторемедиации – быстрыми темпами роста и накопления большой биомассы, способностью к вегетативному размножению и отрастанию после 3–4-разового скашивания за сезон. Самое высокое содержание металла, когда-либо определяемое в растении, отмечено у *Sebertia acuminata* (дерево, растущее только в Новой Каледонии), в млечном соке которого содержится 25 % никеля (из 100 % сухого вещества).

В настоящее время существуют две стратегии использования растений для «извлечения» тяжелых металлов из почв. Первая из них предполагает использование растений-сверхнакопителей, таких как *Thlaspi caerulescens* или *Alyssum bertolonii*. Эти растения специфично поглощают один или два металла, накопление у них небольшой биомассы коррелирует с очень высокими концентрациями металла в побегах. Вторая стратегия основана на использовании высокопродуктивных растений, которые не являются металлоспецифичными, формируют большую надземную биомассу, но количество тяжелых металлов в ней сравнительно невысокое.

Необходимые свойства растений-аккумуляторов металлов следующие:

- отсутствие географических предпочтений и быстрый рост;
- высокая биопродуктивность;

- способность образовывать продукцию комплексного применения;
- сильная корневая система;
- способность к гипераккумуляции тяжелых металлов;
- высокая устойчивость к тяжелым металлам;
- быстрый транспорт металлов в надземные органы;
- способность к аккумулярованию нескольких металлов;
- устойчивость к болезням и вредителям.

Способность растений очищать почвы от ионов тяжелых металлов ограничена многими факторами. Среди них можно назвать такие как доступность металла в почве для поглощения корнями растений, скорость поглощения его корнями, транспорт металла из корня в побег, а также устойчивость растения.

Для увеличения поглощения тяжелых металлов (например, Cd и Pb) и их перемещения из корней в побеги используют синтетические хелаты. Помимо этого, создание трансгенных растений с определенными физиолого-биохимическими характеристиками, способствующими сверхнакоплению тяжелых металлов, является одним из возможных путей развития фиторемедиации как эффективной практической технологии. Однако прогресс в этом направлении пока затруднен недостаточным пониманием физиологических, биохимических и молекулярных механизмов, лежащих в основе гипераккумуляции тяжелых металлов растениями.

Фиторемедиация включает в себя следующие этапы:

1. Высадку растений тех видов, которые способны аккумулировать соответствующие металлы;
2. Обеспечение возможности роста культур;
3. Сбор зеленой массы с последующим сжиганием или компостированием для переработки металлов.

Эта процедура может по мере необходимости повторяться несколько лет, до тех пор, пока уровень загрязнения в почве не снизится до допустимых пределов. При сжигании растений золу необходимо размещать в мотыльки для опасных отходов. Схема технологии фиторемедиации отражена на рис. 12.

Фиторемедиация осуществляется на основе технологий, при которых для очистки загрязненной окружающей среды использу-

ются естественно сформировавшиеся или генетически сконструированные (трансгенные) растения. Среди них выделяют фитостабилизацию и фитоэкстракцию. *Фитостабилизация* – это технология, основанная на способности растений или выделяемых ими соединений стабилизировать содержание загрязняющих веществ в почве на низком уровне за счет поглощения или осаждения. *Фитоэкстракция* – технология извлечения тяжелых металлов из почвы с помощью растений, при этом поглощенные корнями металлы транспортируются в побеги и аккумулируются в надземной части растения.

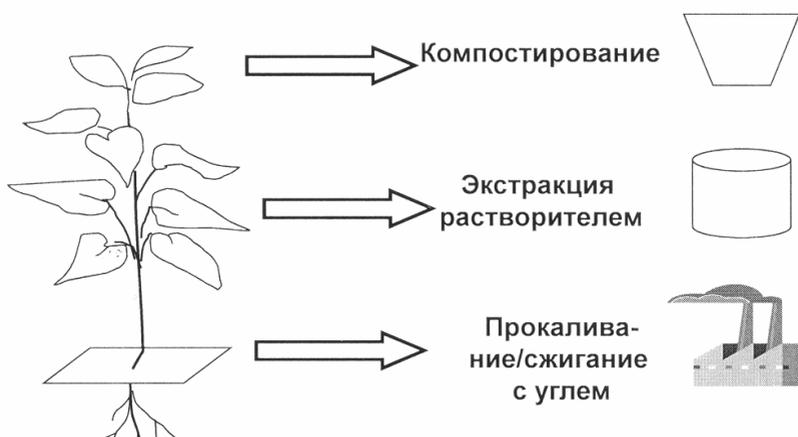


Рис. 12. Технология извлечения тяжелых металлов из почвы с помощью растений (по: Прасад, 2003)

Применение фиторемедиации имеет некоторые ограничения. В значительной степени они включают потенциальное загрязнение растительности и цепей питания и исключительно трудные приживаемость и поддержание нормального роста и развития растений на загрязненных участках. Кроме того, фиторемедиация требует большого периода времени для снижения загрязнения. Для промышленного загрязнения почв из-за высокого уровня в них тяжелых металлов более приемлемой является фитостабилизация, тогда как для сельскохозяйственных земель возможна фитоэкстракция.

## ГЛАВА 6

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЯ И МЕХАНИЗМОВ ИХ МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВОСТИ**

*Эксперименты по изучению влияния тяжелых металлов на растения* проводятся в лабораторных, вегетационных или полевых условиях.

**Лабораторные эксперименты** проводят чаще всего с использованием водной, песчаной культуры или культуры *in vitro* (т. е. в пробирке). Закладка модельного опыта заключается в помещении растений в контролируемые условия климатических камер с заданными параметрами внешней среды (установленной температурой, влажностью воздуха, освещенностью и фотопериодом). Опытные варианты отличаются от контрольного лишь наличием одного или нескольких тяжелых металлов или различных их концентраций в корнеобитаемой среде.

В **вегетационном эксперименте** растения выращиваются в вегетационных домиках, где, в отличие от лабораторных опытов, условия произрастания сходны с естественными. Однако основной фактор, действие которого изучается, в частности, тяжелые металлы в определенной концентрации, четко контролируется исследователем. В вегетационных опытах обычно используется песчаная или почвенная культура.

В лабораторных и вегетационных экспериментах все необходимые измерения интересующих исследователя физиологических показателей проводятся через определенные промежутки времени, зависящие от схемы эксперимента. О влиянии тяжелых металлов на растения судят по изменению величины изучаемого признака (показателя) у растений опытных вариантов по сравнению с контрольным вариантом, растения которого произрастают

в этих же условиях, но при отсутствии действия металла. По отклонению величины измеряемого показателя от контроля можно судить также о силе воздействия тяжелого металла на растения и об их металлоустойчивости.

Эксперименты, проводимые в **полевых (природных)** условиях, предполагают изучение влияния загрязнения почвы (воздуха, воды) тяжелыми металлами на состояние растительности в естественной среде обитания. При полевой оценке обычно учитываются результаты визуальных наблюдений за состоянием растений. Кроме того, проводится морфометрическая оценка отдельных параметров растения, определяется продуктивность его надземной и/или подземной биомассы, а также продуктивность всего фитоценоза, которая рассчитывается на основании измерений общей биомассы растений на выбранных пробных площадях. В качестве контроля в такого рода экспериментах обычно используют относительно «чистые» местообитания, сходные по видовому составу растений, или сравниваются участки, расположенные на разном расстоянии от источника загрязнения.

Как уже было указано, изменения, происходящие в растении под влиянием тяжелых металлов, затрагивают все уровни организации: молекулярный, клеточный, тканевый, органный и организменный. В зависимости от поставленных задач исследователь выбирает методику проведения эксперимента и наиболее надежные и информативные методы. В настоящее время при оценке металлоустойчивости растений используют следующие группы методов: морфометрические, физиологические, анатомо-морфологические, цитологические, биохимические и молекулярно-биологические.

**Морфометрические методы** исследования основаны на визуальной оценке состояния отдельных растений и целых ценопопуляций по высоте побега, размерам листа, степени повреждения листовой поверхности, продуктивности растений, которые используются чаще всего в полевых экспериментах. В вегетационных и лабораторных опытах одним из самых распространенных методов оценки металлоустойчивости растений является метод «корневого теста», предложенный Д. Уилкинсом (Wilkins, 1978). В его основе лежит сравнение прироста корня у опытных (выра-

щенных в присутствии тяжелых металлов) и контрольных растений за определенный промежуток времени. При этом индекс устойчивости растений ( $I_t$ ) рассчитывается по формуле:  $I_t = I_{оп}/I_k$ , где  $I_{оп}$  – прирост корня у растений опытного варианта,  $I_k$  – прирост корня у растений контрольного варианта.

Еще один довольно простой и распространенный метод лабораторной оценки металлоустойчивости видов (сортов, генотипов) растений основан на изучении всхожести их семян в присутствии различных концентраций тяжелых металлов. При его использовании индекс устойчивости рассчитывают по следующей формуле:  $I_t = n_{оп}/n_k \cdot 100 \%$ , где  $n_{оп}$  – число проросших семян в опытном варианте,  $n_k$  – число проросших семян в контрольном варианте.

В основе **физиологических методов** лежит сравнение величин измеряемых физиологических процессов и показателей у растений, выращенных в присутствии тяжелых металлов, с контрольными растениями. Среди наиболее часто используемых физиологических параметров – интенсивность фотосинтеза и дыхания, показатели фотохимической активности и активности ФС II, интенсивность транспирации, устьичная проводимость и оводненность тканей.

**Анатомо-морфологические методы.** О степени повреждения растений тяжелыми металлами можно также судить по изменениям анатомо-морфологической структуры корня и листа. К числу диагностических показателей устойчивости при этом относят: число корневых волосков, число и размеры клеток эпидермиса и коры корня, количество слоев клеток мезофилла листа и их размеры, толщину кутикулы, количество устьиц, размеры устьичной щели, общее число хлоропластов в клетке, число хлоропластов на единицу площади клетки и т. д.

**Цитологические методы** позволяют выявить структурные изменения, происходящие в клетках растений в присутствии тяжелых металлов. При действии высоких концентраций металлов уменьшается общая протяженность мембран, а иногда они полностью разрушаются, наблюдаются повреждение ядра и деградация хромосом. Кроме того, указанными методами в присутствии тяжелых металлов можно зафиксировать замедление интенсив-

ности клеточных делений, увеличение времени прохождения отдельных фаз митоза, отсутствие расхождения хромосом к полюсам клетки.

**Биохимические методы** получили в последние годы очень широкое распространение при изучении механизмов металлоустойчивости растений. Среди них есть довольно простые, не требующие дорогостоящего оборудования и реактивов (определение содержания фотосинтетических пигментов, пролина, активности ферментов антиоксидантной защиты и др.). Вместе с тем за последние десятилетия появились новые современные методы, позволившие более глубоко изучить механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам, действующие на молекулярном уровне. Например, определение содержания в клетках некоторых связывающих тяжелые металлы веществ (фитохелатинов, металлотионеинов), вновь синтезированных защитных (шоковых) белков, а также изучение изменения активности некоторых ферментов, катализирующих синтез этих молекул.

**Молекулярно-биологические методы** позволяют изучать влияние тяжелых металлов на экспрессию генов, принимающих участие в механизмах металлоустойчивости растений. К таким методам относится, в частности, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК. В результате проведенного анализа сравнивается уровень экспрессии какого-либо гена в опытном образце с уровнем его экспрессии в контрольном образце. К молекулярным методам исследования относят и вестерн-блоттинг анализ, с помощью которого определяется содержание различных белков в растительных образцах. Помимо этого, существуют методы, позволяющие создавать трансгенные растения, устойчивые к действию тяжелых металлов, что имеет важное практическое значение.

**Определение содержания тяжелых металлов в растениях.** Важным моментом всех исследований в области фитотоксического действия тяжелых металлов является определение количества токсичных ионов, поступивших в подземные и надземные органы растений. Для этого существует целый ряд методов, которые классифицируют по группам в зависимости от принципа,

заложенного в их основу. В частности, выделяют: полярографические, спектрографические, хроматографические, ионообменные, колориметрические, флуорографические, спектральные и атомно-абсорбционные методы, а также нейтронно-активационный метод. Выбор того или иного метода определяется количеством тяжелых металлов в анализируемых материалах, необходимой точностью и временем определения, техническим и приборным оснащением. Классические методы – аналитико-весовые и объемные – не подходят для определения тяжелых металлов, поскольку не обладают необходимой чувствительностью.

**Полярографические и спектрографические** методы относятся к физическим методам исследования. Полярографический метод – способ определения содержания элементов с помощью измерения электрических свойств растворов, содержащих ионы анализируемых металлов. Спектрографический метод основан на возбуждении атомов металлов в дуге переменного тока, последующем фотографировании полученных спектров и измерении относительно интенсивности окрашивания аналитических линий. Эти методы наименее чувствительные и не охватывают всех возможных концентраций тяжелых металлов в различных типах почв и видах растений.

Для более точного определения тяжелых металлов в растительных образцах в настоящее время используют химические, спектральные и атомно-абсорбционные методы, а также новый нейтронно-активационный метод. Эти методы обладают высокой чувствительностью и универсальностью, что необходимо в современных исследованиях. Многие из современных методов полностью автоматизированы.

К **химическим методам** относятся хроматография и экстракция.

Хроматография – метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.

Экстракция – метод извлечения вещества из раствора или сухой смеси с помощью подходящего растворителя (экстрагента). Для извлечения из раствора применяются растворители, не смешивающиеся с этим раствором, но в которых вещество растворяется лучше, чем в первом растворителе. В качестве несме-

шивающих жидкостей применяют хлористый углерод, хлороформ, эфиры, бензол, толуол и некоторые другие вещества.

**Спектральные методы.** Основаны на изменении света, испускаемого атомами при сообщении им дополнительного количества энергии. Эти методы быстрые, простые и позволяют определить сразу несколько элементов. Наибольшее распространение получил метод рентгеноспектromетрии. Принцип этого метода основан на различной степени возбуждения электронов на внутренних электронных оболочках атомов разных элементов при облучении вещества рентгеновскими лучами. Этот метод позволяет определить все элементы с порядковым номером выше 20. Основное преимущество этого метода – высокая специфичность анализа, так как спектр определяемого элемента не зависит от химического состава целого вещества. Чувствительность метода  $10^{-2}$  %.

**Атомно-абсорбционные методы** определения тяжелых металлов в растениях в настоящее время являются основными и наиболее точными. В основе анализа лежит явление поглощения света атомами определяемого химического элемента. Чувствительность  $10^{-5}$  %.

Наивысшей чувствительностью обладает **нейтронно-активационный анализ**. Он основан на использовании мощного потока медленных нейтронов, полученных в ядерном реакторе. Анализируемое вещество подвергается облучению нейтронами, при этом происходит радиоактивация химических элементов. Образовавшиеся радиоизотопы имеют свои характеристики распада и периода полураспада, что является показателем, по которому определяют тип распада, устанавливают номер изотопа и его концентрацию в веществе. Чувствительность этого метода достигает  $10^{-11}$ – $10^{-13}$  %.

При изучении распределения металлов по тканям растений используют **гистохимический метод** исследования. Он основан на образовании окрашенных или флуоресцирующих комплексов аналитических реагентов с изучаемыми металлами. Например, такие металлы как Cd, Pb и Zn при реакции с дитизоном образуют нерастворимые соли – дитизонаты, обладающие красной окраской. О локализации и накоплении металла судят

по интенсивности окрашивания тканей корня или листа. Полученные с помощью этого метода данные дополняют результаты количественного анализа, что позволяет полнее понять основные закономерности распределения, накопления, а также пути передвижения металлов по растению.

В целом, использование всех перечисленных выше методов дает в той или иной степени представление о влиянии тяжелых металлов на растения. При этом для выбора метода необходимо учитывать его чувствительность, т. е. дифференцирующую способность (возможность достоверно разделить по устойчивости близкородственные объекты), надежность и достоверность оценки, а также наличие необходимой приборной и технической базы.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

*Башмаков Д. И., Лукаткин А. С.* Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений. Саранск: Изд-во Мордовского университета, 2009. 236 с.

*Битюцкий Н. П.* Необходимые микроэлементы растений. СПб.: Издательство ДЕАН, 2005. 256 с.

*Кабата-Пендиас А., Пендиас Х.* Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 440 с.

*Кошкин Е. И.* Физиология устойчивости сельскохозяйственных растений. М.: Дрофа, 2010. 638 с.

*Кузнецов Вл. В., Дмитриева Г. А.* Физиология растений. М.: Высшая школа, 2005. 736 с.

Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация / Под ред. М. Н. Прасада, К. С. Саджвана, Р. Найду. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. 816 с.

*Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф.* Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 172 с.

*Чиркова Т. В.* Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 240 с.

## Дополнительная литература

*Петрунина Н. С.* Геохимическая экология растений в провинциях с избыточным содержанием микроэлементов (Co, Mo, Ni, Pb, Zn) // Проблемы геохимической экологии организмов. Тр. Биогеохим. лаб. АН СССР Т. 13. М.: Наука, 1974. С. 57–117.

*Прасад М. Н.* Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 5. С. 768–780.

*Серегин И. В., Иванов В. Б.* Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 606–630.

*Серегин И. В., Кожевникова А. Д.* Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 2. С. 285–308.

- Федорец Н. Г., Бахмет О. Н., Солодовников А. Н., Морозов А. К.* Почвы Карелии: геохимический атлас. М.: Наука, 2008. 47 с.
- Baker A. J. M., Brooks R. R.* Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry // *Biorecovery*. 1989. V. 1. P. 81–126.
- Baker A. J. M., Walker P. M.* Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants // *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. Boca Raton: CRC Press, Fl. 1990. P. 155–177.
- Barceló J., Poschenrieder C.* Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review // *J. Plant Nutr.* 1990. V. 13. P. 1–37.
- Brooks R. R.* Plants that hyperaccumulate heavy metals. Wallingford: CAB International, 1998. 384 p.
- Brune A., Urbach W., Dietz K.-J.* Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance // *Plant Cell Environ.* 1994. V. 17. P. 153–162.
- Clemens S.* Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // *Planta*. 2001. V. 212. P. 475–486.
- Vassilev A., Tsonev T., Yordanov I.* Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare* L.) to cadmium contamination in soil during ontogenesis // *Environ. Pollut.* 1998. V. 103. P. 289–297.
- Yang X. E., Long X. X., Ye H. B. et al.* Cadmium tolerance and hyperaccumulation in new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance) // *Plant Soil*. 2004. V. 259. P. 181–189.

**Перечень основных тяжелых металлов**

Порядковый номер химического элемента	Символ	Название	Атомная масса
23	V	вольфрам	50,94
24	Cr	хром	52,00
25	Mn	марганец	54,94
26	Fe	железо	55,85
27	Co	кобальт	58,93
28	Ni	никель	58,69
29	Cu	медь	63,55
30	Zn	цинк	65,39
33	As	мышьяк	74,92
34	Se	селен	78,96
38	Sr	стронций	87,62
42	Mo	молибден	95,94
47	Ag	серебро	107,87
48	Cd	кадмий	112,41
50	Sn	олово	118,71
51	Sb	сурьма	121,75
79	Au	золото	196,97
80	Hg	ртуть	200,59
82	Pb	свинец	207,21

**Список видов растений**

- Agrostis castellana* – полевица горная  
*Allium cepa* – лук репчатый  
*Alyssum bertolonii* – бурачок Бертолони  
*Alyssum montanum* – бурачок горный  
*Alyssum murate* – бурачок степной  
*Alyssum serpyllifolium* – бурачок серполистный  
*Arabidopsis halleri* – арабидопсис (кардаминопсис) Галлера  
*Arabidopsis thaliana* – арабидопсис (резуховидка) Таля  
*Armeria maritima* – армерия приморская  
*Armeria plantaginea* – армерия подорожниковая  
*Avena sativa* – овес посевной  
*Brassica juncea* – горчица сарептская  
*Crepis capillaries* – скерда волосовидная  
*Holcus lanatus* – бухарник шерстистый  
*Hordeum vulgare* – ячмень обыкновенный  
*Lathyrus odoratus* – чина душистая  
*Lycopersicon peruvianum* – томат перуанский  
*Melica nutans* – перловник поникающий  
*Minuartia verna* – минуарция весенняя  
*Polycarpea glabra* – поликарпия  
*Pisum sativum* – горох посевной  
*Sedum alfredii* – седум (очиток) Альфреда  
*Silene vulgaris* – смолевка обыкновенная  
*Thlaspi arvense* – ярутка полевая  
*Thlaspi caerulescens* – ярутка сизая  
*Thlaspi goesingense* – ярутка дикая  
*Triticum aestivum* – пшеница мягкая  
*Viola calaminaria* – фиалка желтая  
*Zea mays* – кукуруза обыкновенная

Научное издание

А. Ф. Титов, В. В. Таланова, Н. М. Казнина

**Физиологические основы  
устойчивости растений  
к тяжелым металлам**

*Учебное пособие*

*Утверждено к печати Ученым советом  
Института биологии Карельского научного центра РАН*

Редактор М. А. Радостина  
Оригинал-макет Г. А. Тимонен

Сдано в печать 26.12.2011 г. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.  
Уч.-изд. л. 3,7. Усл. печ. л. 4,53. Тираж 200. Изд. № 254. Заказ № 16

Карельский научный центр РАН  
Редакционно-издательский отдел  
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50