

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 581.17

**ДИФФУЗИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО КАТИОНА
МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В ПОЛИМЕРНОМ МАТРИКСЕ
КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КУСТИСТОГО ЛИШАЙНИКА
CLADONIA RANGIFERINA (L.) F.H. WIGG.****Н.Р. Мейчик, Е.Г. Любимова, И.П. Ермаков***(кафедра физиологии растений)*

Лишайники относятся к организмам, не способным регулировать поглощение и потерю воды. При этом они способны накапливать значительные количества воды в слоевище. В слоевищах лишайников вода может содержаться в симпласте, апопласте и в межклеточных пространствах. По данным более ранних исследований (Beckett, 1997), лишайники по сравнению с высшими растениями теряют тургор лишь при очень низком содержании воды (42%). Это можно объяснить тремя причинами (Palmqvist, 2000). Во-первых, большое количество воды содержится в слоевищах лишайников в межклеточных пространствах, ее испарение не приводит к потере воды клетками лишайников. Во-вторых, клетки лишайников характеризуются значительно большим осмотическим потенциалом по сравнению с клетками высших растений. В-третьих, клеточные стенки лишайников характеризуются большим модулем эластичности (являются менее жесткими), а это приводит к возможности уменьшения объема клеток с сохранением тургора.

Значение клеточной стенки в обеспечении устойчивости лишайников к высыханию не ограничивается способностью к удержанию воды и эластичностью. Возможность взаимодействия ионов с полимерным матриксом клеточных стенок приводит к тому, что раствор, омывающий плазматические мембраны, отличается по своему составу от внешнего раствора. Это во многом обеспечивает избирательное поступление веществ внутрь клетки. Свойства клеточных стенок играют роль в обеспечении устойчивости лишайников к различным стрессовым факторам. Показано, например, что ионы калия и магния, вымывающиеся из клеток лишайников при высыхании, адсорбируются в клеточных стенках и могут поступать обратно в клетку при повторном увлажнении (Buck, Brown, 1979).

Известно, что в клеточных стенках микобионта лишайников могут задерживаться в значительных количествах ионы тяжелых металлов. Свойства клеточных стенок могут, по-видимому, опреде-

лять количество токсичных веществ, поступающих внутрь клетки, и тем самым обуславливать видовую чувствительность лишайников к загрязнениям. Сорбционные свойства грибных клеточных стенок изучали на примере свободноживущих грибов (Gallun et al., 1982; Wales, Sagar, 1990; Феофилова и др., 1994; Mar'in et al., 1998; Феофилова et al., 2000), а также грибного компонента некоторых лишайников (Puckett et al., 1973; Nieboer et al., 1976; Nieboer et al., 1979; Haas et al., 1998). Установлено, что поглощение веществ клеточными стенками происходит по механизму комплексообразования и по ионообменному механизму. По данным многих авторов (Puckett et al., 1973; Nieboer et al., 1976; Nieboer et al., 1979; Haas et al., 1998 и др.), ионообменный механизм является основным в процессах поглощения ионов лишайниками. Высказывались предположения о возможности участия аминокрупп хитина, а также карбоксильных и фосфатных групп матрикса клеточных стенок в процессах адсорбции ионов.

Таким образом, ионообменные свойства клеточных стенок играют большую роль в процессах транспорта воды и растворенных веществ внутри слоевища, а также в поступлении растворов внутрь клетки. Свойства клеточных стенок как катионообменника можно охарактеризовать такими физико-химическими параметрами, как коэффициент набухания полимерного матрикса и коэффициент диффузии ионов в матриксе (Гельферих, 1962; Grignon, Sentenac, 1991). Несмотря на то что диффузия, как полагают многие исследователи (Aloni et al., 1998), является определяющей стадией при передвижении ионов и воды в апопласте, к настоящему времени для грибных клеточных стенок (в частности, для клеточных стенок микобионта лишайников) экспериментальных данных о скорости диффузии ионов в ее матриксе, о влиянии этого свойства на транспорт ионов до сих пор получено не было.

В настоящей работе проведена количественная оценка диффузии ионов в клеточных стенках, изолированных из лишайника, и определен ее

возможный вклад в процессы поглощения веществ слоевищем.

В качестве объекта исследования нами выбран кустистый лишайник *Cladonia rangiferina* (L.) F.H. Wigg. Этот вид широко распространен в бореальной зоне. По чувствительности к антропогенным загрязнениям относится к чувствительным видам.

Выделение клеточной стенки лишайника проводили в соответствии с методикой, описанной ранее (Мейчик и др., 1999; Meychik, Yermakov, 1999). В слоевищах выбранного нами вида лишайников микобионт значительно преобладает по массе над фикобионтом. Исходя из этого, мы считаем полученные результаты характеристикой клеточных стенок микобионта. Слоевища лишайников промывали водой, удаляли отмершие части подоцветов. Образцы помещали в стеклянную ионообменную колонку ($V = 200$ мл) и промывали в динамических условиях последовательно 10 mM NaOH, дистиллированной водой, 10 mM HCl и дистиллированной водой до отсутствия Cl^- в промывных водах. Затем материал высушивали в присутствии поглотителя ($CaCl_2$) до постоянного веса при 55–60°. Переведение всех имеющихся в структуре клеточной стенки катионообменных групп в H^+ -форму позволяет проводить сравнительное исследование сорбционных свойств ионообменных материалов с различной структурой функциональных групп (Лейкин и др., 1978; Мейчик и др., 1999; Meychik, Yermakov, 1999).

В качестве химического реагента для слежения за процессом диффузии использовали метиленовый синий (МС). Этот краситель образует в водном растворе окрашенный катион. Набухшие в воде клеточные стенки и интактные слоевища обсушивали фильтровальной бумагой, определяли сырую массу и погружали в раствор с концентрацией МС 0,032 мг/мл (0,0001 М). Далее измеряли поглощение МС. Эксперименты проводили при перемешивании на шейкере со скоростью 60 кол/мин. После погружения образцов в раствор МС через определенные промежутки времени отбирали пробы по 1 мл. После соответствующего разбавления в пробах определяли концентрацию МС спектрофотометрическим методом при 650 нм (анализатор Униплан, Россия). Используемые в опыте образцы высушивали при температуре 50° до постоянного веса, после чего определяли их сухую массу. Концентрацию МС в каждой точке и его количество, поглощенное образцами, рассчитывали по формуле:

$$M_i^t = \frac{C_0 V_0 - C_i^t V_i^t - \sum_{i=2}^n (C_{i-1} V_{np})}{319g},$$

где M_i^t — количество МС, поглощенное за время t (мкмоль на 1 г сухой массы слоевищ или выде-

ленных клеточных стенок), C_0 и C_i^t — концентрация реагента в растворе в нулевой точке ($t = 0$) и в момент времени t (мкг/мл), V_0 — начальный объем раствора (мл), V_i^t — объем раствора в момент взятия пробы (мл), n — количество проб для анализа, i — номер пробы, V_{np} — объем отобранной пробы (мл), C_{i-1} — концентрация МС в растворе ($i - 1$) пробы, мкг/мл; g — навеска образцов (сухая масса), г; 319 — молекулярная масса МС.

Измерения поглощения МС клеточными стенками в зависимости от pH проводили в 0,0001 М растворе красителя объемом 150 мл. Через 3 ч материал удаляли из раствора, в котором определяли концентрацию МС, как описано выше. Поглощение МС рассчитывали по формуле

$$M_{pH} = \frac{(C_{исх} - C_{кон}) \times V}{g \times 319},$$

где M_{pH} — сорбционная способность клеточных стенок по МС при данных условиях (pH, концентрация МС, соотношение образец — раствор, температура), мкмоль/г сухой массы; $C_{исх}$ и $C_{кон}$ — начальная и конечная концентрация МС в растворе, мкг/л; V — объем раствора, 150 мл; g — сухая масса образцов, г; 319 — молекулярная масса МС.

Для определения коэффициента набухания и относительной сухой массы клеточных стенок фрагменты интактных слоевищ лишайников увлажняли, погружая в воду на 30 мин. Увлажненные слоевища и набухшие в воде стандартизованные клеточные стенки обсушивали фильтровальной бумагой и определяли их сырую массу (FW и FW^{cw} соответственно). Затем образцы клеточных стенок высушивали при 50° до постоянного веса и определяли их сухую массу (DW и DW^{cw}). Весовой коэффициент набухания стандартизованных клеточных стенок (K^{cw}) определяли по формуле (Гельферих, 1962)

$$K^{cw} = \frac{FW^{cw} - DW^{cw}}{DW^{cw}},$$

где FW^{cw} и DW^{cw} — сырая и сухая масса стандартизованных клеточных стенок, г.

Относительную сухую массу (G) клеточных стенок определяли по формуле

$$G = \frac{DW^{cw}}{DW} \times 100\%,$$

где DW — сухая масса слоевища, а DW^{cw} — сухая масса выделенной из него клеточной стенки.

Полученные нами кинетические кривые поглощения МС интактными слоевищами *C. rangiferina* и изолированными из них клеточными стенками имеют вид экспоненциальной зависимости (рис. 1). При этом максимальные значения поглощения красителя клеточными стенками и интактными слое-

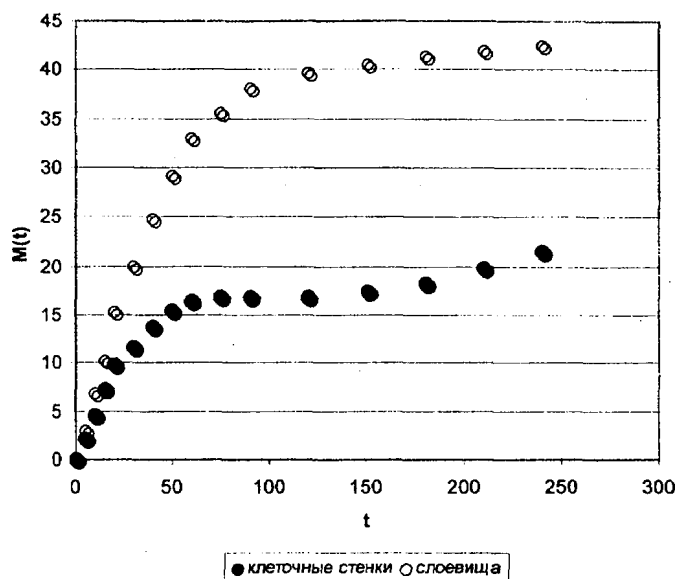


Рис. 1. Кинетические кривые поглощения метиленового синего интактными слоевищами *C. rangiferina* и изолированными из них клеточными стенками.

$M(t)$ — поглощение катиона метиленового синего в зависимости от времени (t) слоевищами лишайников и выделенными из них клеточными стенками (мкмоль красителя на 1 г сухой массы образца). Объем раствора — 150 мл, концентрация красителя — 0,0001 М

вищами достигаются примерно за 150 мин. Этот результат сравним с результатами, полученными в сходных экспериментах другими авторами, хотя они использовали лишайники других видов и растворы других ионов, а также разные методы подготовки материала. Так, Паккетт с соавторами (Puckett et al., 1973) изучали сорбцию меди слоевищами лишайников *Umbilicaria muhlenbergii* и *Cladonia mitis*. Максимум поглощения достигался в слоевищах этих лишайников за 60 мин. Гааз с соавторами (Haas et al., 1998) при исследовании поглощения урана из растворов слоевищами *Peltigera membranacea* установили, что максимальное поглощение катиона достигалось не менее чем через два часа контакта образцов с раствором. Полученные нами результаты более соответствуют данным, полученным для *P. membranacea*. Важно учитывать, что в рассматриваемой работе в опытах использовались цельные слоевища, тогда как в работе Puckett с соавторами (1973) использовали измельченные талломы. Это могло способствовать более быстрому поступлению ионов к клеткам и, в частности, к клеточным стенкам.

Максимальное поглощение МС составило для изолированных клеточных стенок 75 мкмоль/г сухой массы, а для интактных слоевищ — 145 мкмоль/г сухой массы. Можно сравнить эти результаты с результатами, полученными другими исследователями для других видов лишайников с использованием других ионов. Ранее (Puckett et al., 1973; Nieboer et al., 1979; Chettri et al., 1996) показана зависи-

мость поглощения катионов лишайниками от природы поглощаемых ионов. Одновалентные катионы поглощаются в большем количестве, чем поливалентные, что объясняется тем, что поглощение катионов клеточными стенками происходит преимущественно по ионообменному механизму. Тем не менее результаты, полученные нами для поглощения МС *C. rangiferina*, сопоставимы с результатами, полученными другими авторами в указанных работах по поглощению катионов слоевищами лишайников.

Максимальное поглощение МС, определенное нами для интактных слоевищ *C. rangiferina*, почти в два раза превышает этот параметр, характеризующий изолированные из слоевищ клеточные стенки. Это говорит о том, что практически половина катионов, содержащихся в растворе данной концентрации, поступает внутрь клеток лишайника. В более ранних работах (Brown, Beckett, 1985) на примере лишайников *Cladonia portentosa* и *P. horizontalis* было показано, что ионы Cd, поступая внутрь слоевища, сначала связываются с клеточными стенками, а потом поступают в клетки. Нужно отметить, что все перечисленные виды, включая *C. rangiferina*, относятся к видам, чувствительным к загрязнениям. Вероятно, это может быть обусловлено недостаточной задержкой токсичных ионов в клеточной стенке.

На рис. 2 видно, что поглощение МС зависит от pH внешнего раствора. Сходные закономерности были получены в других исследованиях, например для *Cladonia mitis*, *Umbilicaria muhlenbergii* (Puckett et al., 1973) и *Peltigera membranacea* (Haas et al., 1998). Необходимо отметить, что максимальное поглощение катионов слоевищами этих видов лишайников наблюдалось при pH 4,5–5, тогда как

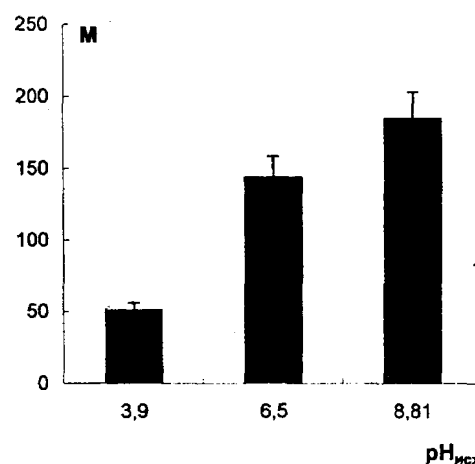


Рис. 2. Поглощение метиленового синего клеточными стенками, изолированными из слоевищ *C. rangiferina* при разных значениях pH.

M — поглощение катиона метиленового синего клеточными стенками *C. rangiferina* (мкмоль/г сухой массы) за 3 ч контакта образцов со 150 мл раствора красителя с концентрацией 0,0001 М. pH_{исх} — pH исходных растворов. Бары — стандартное отклонение

в настоящем исследовании для *C. rangiferina* максимальное поглощение определено при нейтральных значениях pH. Вероятно, это объясняется наличием в структуре их клеточных стенок других, по сравнению с *C. rangiferina*, функциональных групп с другими константами ионизации.

Наличие зависимости поглощения катионов от pH подтверждает предположение о преимущественно ионообменном характере процесса поглощения катиона клеточными стенками лишайника, поэтому экспериментальные кинетические кривые можно анализировать по уравнениям, описывающим кинетику ионного обмена (Кокотов, Пасечник, 1970). Анализ полученных кривых в полулогарифмических координатах $\ln(1-F) = f(t)$ (где F — степень завершенности процесса) показывает, что процесс протекает в смешанно-диффузионной области (ломаный вид полученной кривой) (рис. 3). Коэффициент диффузии иона может быть рассчитан по уравнению для расчета диффузии в круговой цилиндр бесконечной длины с радиусом R , которое имеет вид (Кокотов и Пасечник, 1970)

$$F = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{4}{\mu_n^2} \exp(-\mu_n^2 F_0),$$

где $F_0 = Dt/R^2$; D — коэффициент диффузии иона в ионите, $\text{см}^2/\text{с}$; t — время, с; μ_n — корни некоторого характеристического уравнения, из которых первые три $\mu_1 = 2,4048$; $\mu_2 = 5,5201$; $\mu_3 = 8,6537$.

Расчеты показали, что коэффициент диффузии органического катиона в клеточных стенках слоевища лишайника составляет $7 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$.

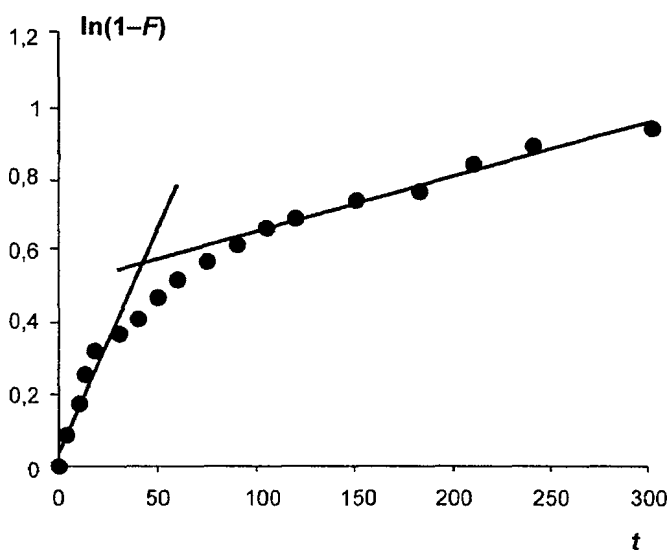


Рис. 3. Кинетические кривые поглощения красителя метиленового синего (МС) клеточными стенками лишайника в координатах.

$F = f(t)$. F — степень завершенности процесса, равная отношению количества поглощенного МС в момент времени t к максимальной емкости клеточных стенок по МС

Коэффициент набухания клеточных стенок в воде составил $1,98 \pm 0,19$. Относительная сухая масса клеточной стенки составляет $66 \pm 6\%$. Полученные результаты позволяют количественно оценить степень концентрирования катиона МС в фазе клеточной стенки при низкой ионной силе внешнего раствора. На основании данных об относительной массе клеточных стенок, о коэффициенте их набухания в воде и полагая, что плотность сухого вещества клеточных стенок и лишайника одинакова и приблизительно равна 1, можно оценить объем стенок, который находится в 1 г сырой массы слоевища. Этот объем равен $\sim 0,7$ мл. Такой объем клеточных стенок этого лишайника максимально адсорбирует ~ 20 мкмоль МС. Тогда концентрация МС в клеточных стенках составит 28 мМ. При этих условиях и допущениях коэффициент концентрирования, равный $k_{\text{конц}} = C^{\text{cw}}/C^0$, где C^{cw} и C^0 — объемная концентрация МС в клеточной стенке и исходном растворе (0,1 мМ), составит 280, т.е. концентрация в клеточных стенках в 280 раз выше, чем в исходном растворе.

Эти данные позволяют говорить о достаточно высокой способности клеточных стенок к концентрированию. Браун и Беккет (Brown, Beckett, 1985) продемонстрировали на примере поглощения Cd лишайниками различия в концентрации катиона внутри клеток и во внешнем растворе. Для *P. membranacea* внутри клеток концентрация была выше, чем в растворе, что говорит об участии клеточных стенок в концентрировании раствора при прохождении к клеточным мембранам. При этом измерений содержания Cd в клеточных стенках авторы не проводили. По-видимому, у разных видов лишайников клеточные стенки обладают различной способностью к удерживанию и концентрированию катионов. Изучаемый нами вид, так же как и *P. membranacea*, относится к видам, чувствительным к загрязнению. Менее чувствительные виды способны, возможно, удерживать в клеточной стенке большие количества катионов.

Значения коэффициента диффузии и коэффициента набухания клеточных стенок в воде не бы-

Набухание и коэффициенты диффузии метиленового синего в клеточных стенках, изолированных из лишайника *C. rangiferina* и корней некоторых видов высших растений

Вид	$D \cdot 10^{-8}$	K^{cw}
Лишайник	0,7	$2,0 \pm 0,2$
Огурец	3,1	$7,3 \pm 0,7$
Пшеница	1,3	$6,4 \pm 0,2$
Кукуруза	8,4	14 ± 1

Примечание. D — коэффициент диффузии катиона в клеточных стенках ($\text{см}^2/\text{с}$), K^{cw} — коэффициент набухания клеточных стенок (г $\text{H}_2\text{O}/\text{г}$ сухой массы клеточных стенок).

ли получены ранее для грибных клеточных стенок. Но эти результаты можно сравнить с полученными для клеточных стенок высших растений, изолированных из корней (таблица). Для определения указанных коэффициентов в этих работах использовали ту же методику. Полученные нами для лишайников значения свидетельствуют о значительно большей степени сшивки между макромолекулами полимерного матрикса клеточных стенок. Это, а также большая толщина клеточных стенок (большая относительная сухая масса), свидетельствуют о высокой способности клеточных стенок лишайников к концентрированию веществ.

Таким образом, можно заключить, что поглощение ионов клеточными стенками происходит по ионообменному механизму. Поступление ионов внутрь клетки определяется физико-химическими свойствами клеточных стенок. Клеточные стенки лишайников характеризуются высокой способностью к концентрации ионов.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-04-49379).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гельферих Ф. 1962. Иониты. М.
- Кокотов Ю.А., Пасечник В.А. 1970. Равновесие и кинетика ионного обмена. Л.
- Лейкин Ю.А., Мейчик Н.Р., Соловьев В.К. 1978. Кислотно-основное равновесие полиамфолитов с пиридиновыми и фосфоновокислотными группами // Журн. физ. химии. 52. № 7. 1420—1424.
- Мейчик Н.Р., Ермаков И.П., Саватеева М.В. 1999. Ионогенные группы клеточной стенки корней пшеницы // Физиол. раст. 46. № 4. 1—6.
- Феофилова Е.П., Мар'ин А.П., Терешина В.М. 1994. Сорбция ионов свинца *Aspergillus niger*. Влияние предварительной обработки мицелия // Прикладная биохим. и микробиол. 30. № 1. 149—155.
- Aloni R., Enstone D.E., Peterson C.A. 1998. Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species // Planta. 207. 1—7.
- Beckett R.P. 1997. Pressure-volume analysis of a range of poikilohydric plants implies the existence of negative turgor in vegetative cells // An. of Bot. 79. 145—152.
- Brown D.H., Beckett R.P. 1985. The role of the cell wall in the intracellular uptake of cations by lichens // P. Lichen Physiology and cell biology / Ed. D.H. Brown. New York. P. 247—258.
- Buck G.W., Brown D.H. 1979. The effect of desiccation on cation location in lichens // An. of Bot. 44. 265—277.
- Chettri M.K., Sawidis T., Zachariadis G.A., Stratis J.A. 1996. Uptake of heavy metals by living and dead *Cladonia thalli* // Environ. and Experimen. Bot. 37. 39—52.
- Феофилова Е.П., Мар'ин А.П., Терешина В.М., Немцев Д.М., Козлов В.П. 2000. Role of components of cell walls in metal uptake by *Aspergillus niger* // Resource and Environment. Biotechnol. 3. 61—69.
- Galun M., Keller P., Malki D. 1982. Removal of Uranium (VI) by fungal biomass and fungal wall-related biopolymers // Science. 219. 285—286.
- Grignon C., Sentenac H. 1991. pH and ionic conditions in the apoplast // An. Rev. of Plant Physiol. 42. 103—128.
- Haas J.R., Bailey E.H., Purvis O.W. 1998. Bioaccumulation of metals by lichens: Uptake of aqueous uranium by *Peltigera membranacea* as a function of time and pH // Amer. Mineralogist. 83. 1494—1502.
- Mar'ин A.P., Conti C., Gobbi G. 1998. Sorption of lead and cesium by mushrooms grown in natural conditions // Resource and Environment Biotechnol. 2. 35—50.
- Meychik N.P., Yermakov I.P. 1999. A new approach to the investigation on the ionogenic groups of root cell walls // Plant and Soil. 217. 257—264.
- Nieboer E., Puckett K.J., Grace B. 1976. The uptake of nickel by *Umbilicaria muhlenbergii* P. a physicochemical process // Canadian J. of Bot. 54. 724—733.
- Nieboer E., Richardson D.H.S., Lavoie P., Padovan D. 1979. The role of metal-ion binding in modifying the toxic effects of sulfur dioxide on the lichen *Umbilicaria muhlenbergii* // New Phytologist. 82. 621—632.
- Palmquist K. 2000. Carbon economy in lichens // New Phytologist. 148. 11—36.
- Puckett K.J., Nieboer E., Gorzynski M.J., Richardson D.H.S. 1973. The uptake of metal ions by lichens: a modified ion-exchange process // New Phytologist. 72. 329—342.
- Wales D.S., Sagar B.F. 1990. Recovery of metal ions by microfungus filters // J. Chem. Tech. Biotechnol. 49. 345—355.

Поступила в редакцию
1.12.04

**DIFFUSION OF THE ORGANIC CATION IN THE POLYMERIC MATRIX
OF THE CELL WALLS OF THE CRUSTOSE LICHEN
CLADONIA RANGIFERINA (L.) F.H. WIGG.**

N.R. Meychik, E.G. Lyubimova, I.P. Yermakov

Diffusion inside the polymeric matrix of the cell walls is a process, which determines the possibility and the rate of ion entry inside the cell. In this paper the quantitative estimation of the ion diffusion in the cell walls isolated from crustose lichen *C. rangiferina* (L.) F.H. Wigg. was done and its possible contribution to processes of absorption in lichen thalli was estimated. We have determined the coefficient of swelling of the cell wall matrix and the diffusion coefficient of the organic cation in the lichen cell walls. Our results show that lichen cell walls characterize by higher cross-linking degree and by smaller diffusion coefficient than plants.