

УДК 581.2.002

Оценка токсичности тяжелых металлов для водного растения *Elodea canadensis*

Т.А. Зотина^{a,b,*}, Н.А. Гаевский^b, Е.А. Радионова^b

^a Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук,
Россия 660036, Красноярск, Академгородок

^b Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79¹

Received 1.06.2009, received in revised form 8.06.2009, accepted 15.06.2009

В лабораторных экспериментах оценивали действие тяжелых металлов (Cu, Mn, Co, Ni, Zn) на физиологические показатели погруженного водного растения *Elodea canadensis*: состояние фотосинтетического аппарата по изменению сигнала эпифлуоресценции хлорофилла; фототаксис хлоропластов; катионную проницаемость клеточных мембран, по выходу ионов калия из клеток. Эксперименты показали, что по чувствительности к тяжелым металлам (скорости проявления токсического эффекта) тест-реакции можно ранжировать следующим образом: флуоресценция хлорофилла > фототаксис хлоропластов > выход K⁺ из клеток. По чувствительности фототаксиса хлоропластов, как наиболее интегральной реакции из трех исследованных, металлы можно ранжировать следующим образом: Mn < Ni < Co < Cu ≤ Zn.

Ключевые слова: катионная проницаемость клеточных мембран; тяжелые металлы; фототаксис хлоропластов; эпифлуоресценция хлорофилла, *Elodea canadensis*.

Введение

Водные экосистемы подвергаются загрязнению тяжелыми металлами в результате природных и техногенных процессов. Источником поступления тяжелых металлов в экосистему реки Енисей является крупный промышленно-коммунальный комплекс г. Красноярска. Многие тяжелые металлы относятся к жизненно важным элементам, которые выполняют структурную и регуляторную функции. Водные растения, как и большинство других биологических объектов различного уровня организации, проявляют избирательную чувствительность к тяжелым металлам. Для оценки токсично-

сти вод широко используется ряска *Lemna spp.* (Moody, Miller, 2005; Horvat et al., 2007) и значительно реже погруженные макрофиты (*Elodea canadensis*, *Myriophyllum spicatum* и др.) (Малёва и др., 2004; Sanchez et al., 2007; Knauer et al., 2008). *E. canadensis* Michx относится к числу наиболее чувствительных к тяжелым металлам погруженных макрофитов (Küpper et al., 1996). Перечень тест-функций и тест-параметров, применяемых для оценки токсичности поллютантов, включает показатели роста, интенсивность фотосинтеза и состояние фотосинтетического аппарата, морфологические характеристики, цитогенетические показатели, а также различные

* Corresponding author E-mail address: t_zotina@ibp.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

специфические реакции водных растений (Цаценко, Малюга, 1998; Болсуновский и др., 2007; Küpper et al., 1998; Moody, Miller, 2005; Esposit et al., 2007; Horvat et al., 2007; Arts et al., 2008). К числу наиболее экспрессных и интегральных показателей оценки физиологического состояния растений можно отнести фототаксис хлоропластов в листьях, флуоресценцию хлорофилла и проницаемость клеточных мембран. Элодея относится к видам, морфология которых позволяет наблюдать и количественно оценивать реакцию фототаксиса хлоропластов под световым микроскопом. Это растение является типичным представителем флоры реки Енисей (Zotina, 2008) и космополитом в водоемах северного полушария нашей планеты.

Цель данной работы – сравнить чувствительность физиологических реакций у *Elodea canadensis* к тяжелым металлам и оценить перспективы дальнейшего использования этого вида для оценки качества вод.

Материалы и методы

Образцы *Elodea canadensis* собирали в прибрежной зоне реки Енисей в пределах г. Красноярска, выше сброса коммунальных стоков. До проведения экспериментов растения адаптировали в аквариуме с отстоянной водопроводной водой в течение 4-5 дней при температуре 19-20 °С и освещении люминесцентными лампами (2 кЛк на поверхности воды) с фотопериодом 14 часов свет, 10 часов темнота.

Для экспериментов использовали апикальные побеги длиной 3 см. Экспозицию в среде с тяжелыми металлами проводили при естественном освещении и фотопериоде при 11-часовом световом дне у северного окна. Температура воды составляла 18-20 °С.

Растения подвергали воздействию металлов в растворах: марганца сернокислого

($MnSO_4 \cdot 5H_2O$), никеля хлористого ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), кобальта азотнокислого ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), меди сернокислой ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и цинка сернокислого ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), приготовленных на дистиллированной воде в концентрациях 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 и 100 мг/л. В стакан с 50 мл исследуемого раствора помещали по 3 апикальных побега.

Перед исследованием фототаксиса хлоропластов стаканы с побегами элодеи выдерживали в темноте в течение 15-30 минут. Фототаксис наблюдали на клетках верхней поверхности листьев под световым микроскопом МИКМЕД-2 (Ломо, Россия) при увеличении в 600 раз. Лист отделяли от побега, помещали под покровное стекло и выдерживали на предметном столике микроскопа при включенной лампе нижней подсветки в течение 3-5 минут. В норме при интенсивном освещении хлоропласты принимали парастрофное положение (перпендикулярное лучам падающего света), отходили к краям клетки и совершали циклическое движение по периметру клетки. Долю активных хлоропластов рассчитывали как отношение числа хлоропластов, принявших парастрофное положение и отошедших к краям клетки, к общему числу хлоропластов в клетке. Для каждой концентрации просматривали по 10 произвольно выбранных клеток на одном листе, в одной или трех повторностях.

Для измерения эпифлуоресценции хлорофилла лист элодеи помещали под покровное стекло и вносили каплю гербицида симазина ($C_7H_{12}ClN_5$, 10^{-5} М), блокирующего нециклический транспорт электронов между двумя фотосистемами. Эпифлуоресценцию измеряли с помощью микроскопа Люмам-И и ФМЭЛ (ЛОМО, Россия) при возбуждении светом с длиной волны 410 нм в круге диаметром 45 мкм при среднем размере клеток 60 x 70 мкм. На каждом листе измеряли по 10 полей

при произвольном перемещении препарата, в одной или трех повторностях.

Нарушение проницаемости клеточных мембран оценивали по выходу ионов калия в окружающий раствор. Концентрацию калия в воде измеряли на пламенном фотометре FLAPHO-4 (Karl Zeiss, Jena) в двух повторностях для каждой концентрации металла. Измерения содержания калия в воде выполнены аналитической лабораторией Института биологии СО РАН.

Результаты представлены как средние или средневзвешенные значения. Достоверность различий средних сравнивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты

Влияние металлов на фототаксис хлоропластов

На рис. 1 (а-д) отражена доля способных к фототаксису (активных) хлоропластов в клетках листьев элодеи при различных концентрациях ионов тяжелых металлов в окружающем растворе. Через 1 час после начала воздействия полное ингибирование фототаксиса наблюдалось в присутствии всех металлов в концентрациях 10 и 100 мг/л, кроме марганца. При концентрациях марганца 100 и 10 мг/л доля активных хлоропластов снижалась на 63 и 34 % соответственно. При концентрации металлов 1 мг/л через 1 час наблюдалось снижение числа активных хлоропластов на 20-40 % в присутствии никеля, кобальта и цинка. При более низких концентрациях металлов ингибирования фототаксиса не зарегистрировано.

Через 24 часа было ингибирование фототаксиса у 40 – 80 % хлоропластов при самой низкой из изученных концентраций металлов (0,001 мг/л) в присутствии всех металлов, кроме марганца. Через 48 часов полное ингибирование фототаксиса зарегистрировано в

присутствии меди, кобальта, никеля и цинка при концентрации 0,001 мг/л.

Влияние металлов на эпифлуоресценцию хлорофилла «а»

Исследование динамики флуоресценции хлорофилла показало, что уже через одну минуту после начала воздействия ионов меди в концентрации 100 мг/л сигнал эпифлуоресценции снижается на 30 % по сравнению с контролем, через 10 минут - на 80 % до стационарного значения, которое не изменяется в течение следующего часа (рис. 2).

Достоверное снижение флуоресценции хлорофилла под действием всех протестированных металлов регистрировалось раньше, чем ингибирование фототаксиса. Так, при концентрациях металлов 0,001-0,01 мг/л через час не было достоверного ингибирования фототаксиса (рис. 1), но отмечено достоверное ($P < 0,05$) снижение сигнала флуоресценции в присутствии всех металлов (рис. 3). При более высоких концентрациях металлов (за исключением марганца) сигнал эпифлуоресценции снижался до минимальных значений, на уровне порога детектирования, эти значения не приведены на рисунке. Через 24 и 48 часов наблюдалось дальнейшее снижение сигнала эпифлуоресценции хлорофилла «а» в присутствии всех металлов (рис. 3).

Выход ионов калия из клеток

Концентрация калия в воде в контроле через 1 час была ниже предела обнаружения (рис. 4). В некоторых экспериментальных вариантах измерений концентраций калия в растворе проведено не было, соответствующие столбики отсутствуют на рис. 4. Через час после начала воздействия тяжелых металлов наиболее значительный выход калия в воду из клеток элодеи зарегистрирован только при самой высокой концентрации металлов

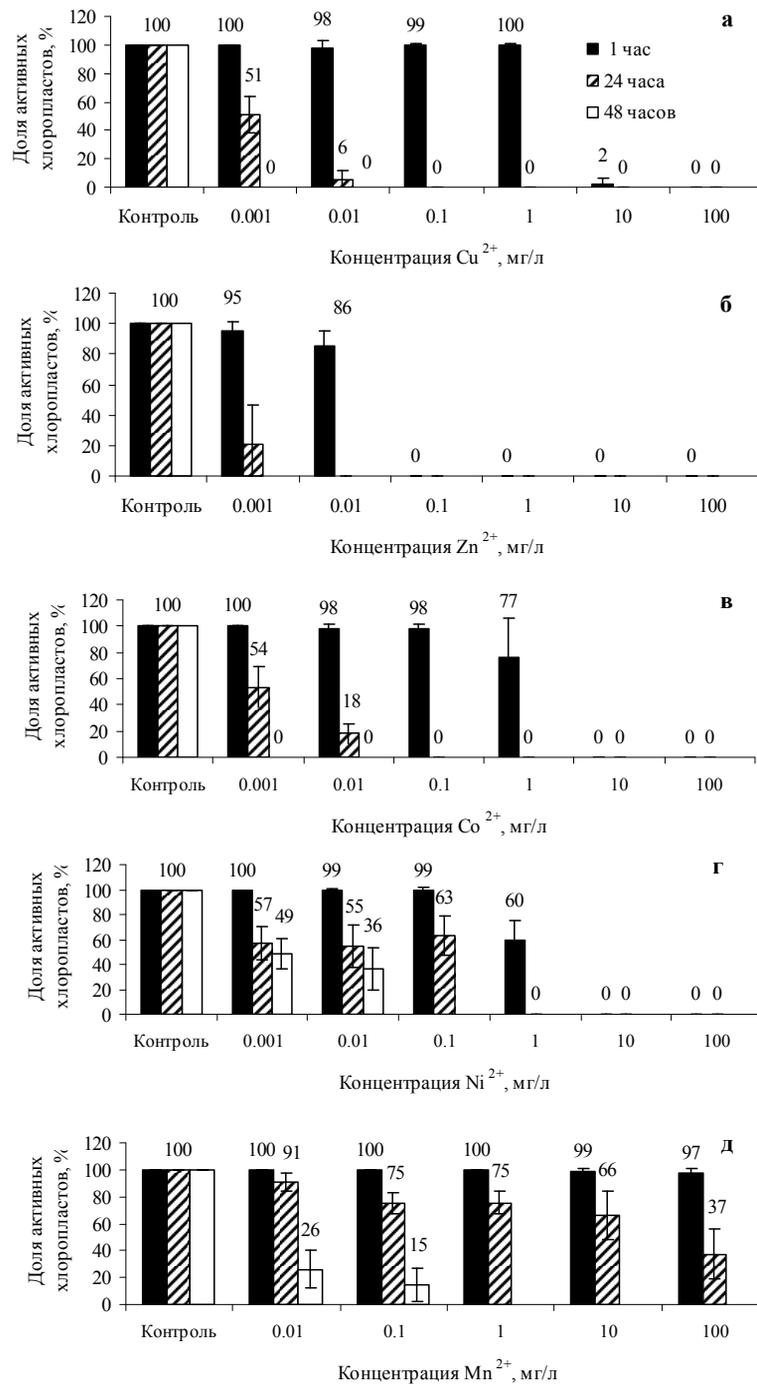


Рис. 1. Доля активных хлоропластов в клетках при различных концентрациях металлов в воде через 1, 24 и 48 часов экспонирования (на столбиках нанесены значения стандартных отклонений средних, SD, n=30)

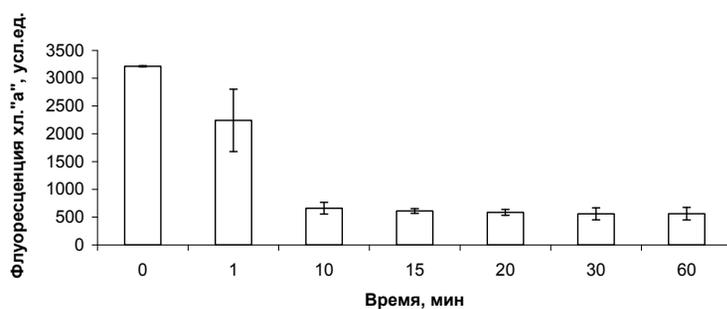


Рис. 2. Динамика эпифлуоресценции хлорофилла «а» листьев (усл. ед.) при концентрации ионов меди (100 мг/л), приводящей к полному ингибированию фототаксиса через 1 час (на столбиках нанесены значения стандартных отклонений средних, SD, n=10)

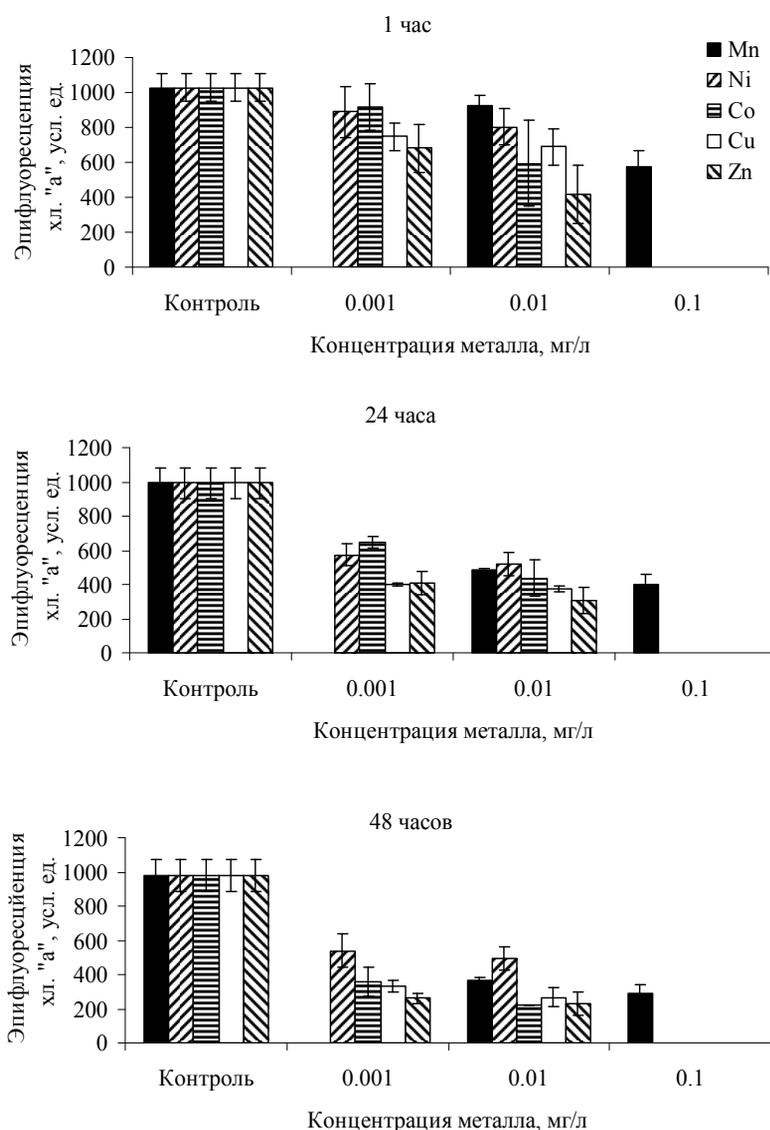


Рис. 3. Эпифлуоресценция хлорофилла «а» листьев (усл. ед.) в присутствии ионов металлов в воде через 1, 24 и 48 часов экспонирования (на столбиках нанесены значения стандартных отклонений средних, SD, n=10)

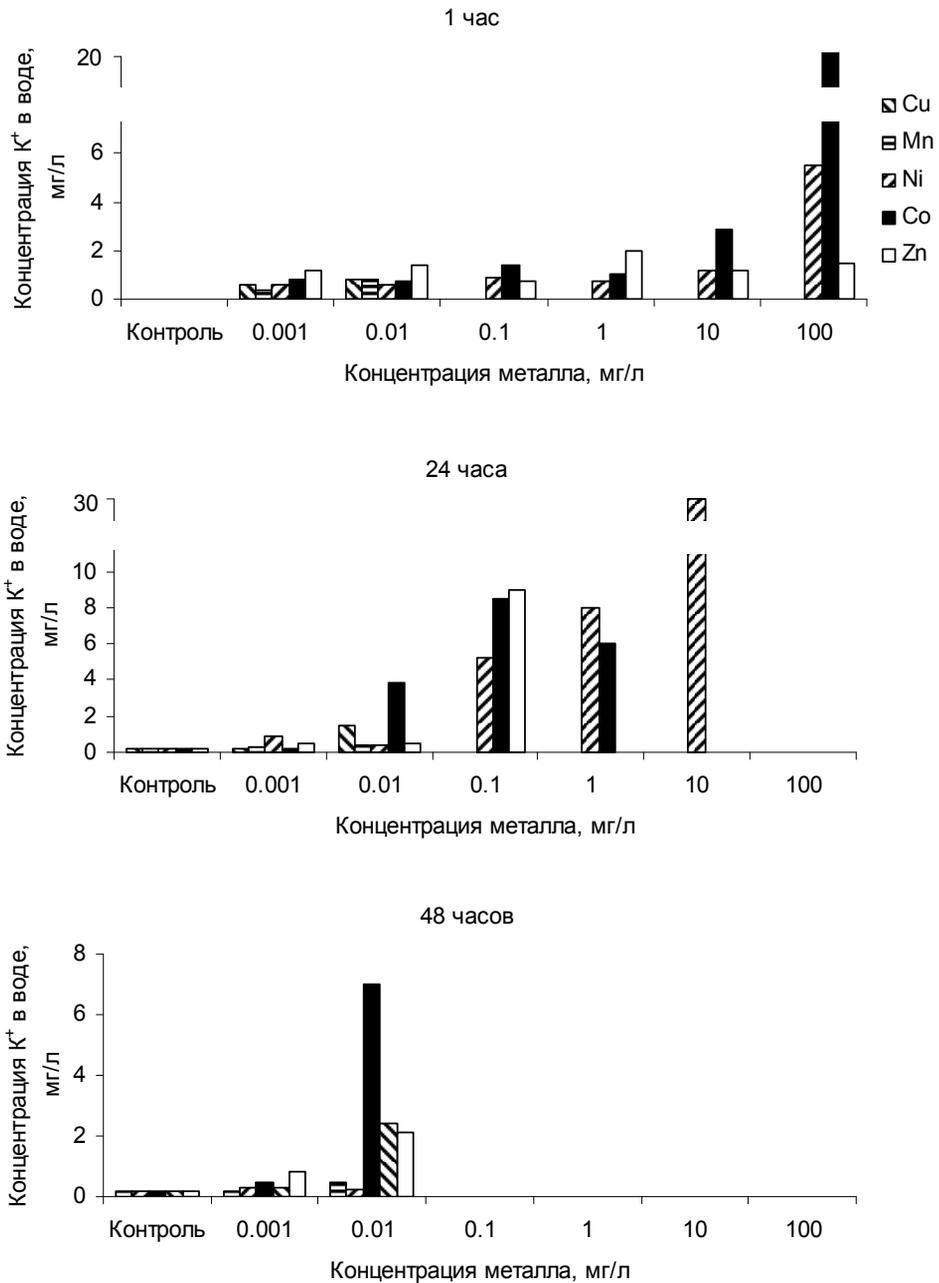


Рис. 4. Концентрация ионов калия в воде при различных концентрациях ионов металлов через 1 час, 24 часа и 48 часов воздействия на элодею. Концентрация калия в контроле через один час была ниже предела обнаружения (пояснения см. в тексте)

(100 мг/л), кроме марганца и цинка. Через 24 часа наблюдался значительный выход калия в воду при концентрациях металлов (Ni, Co, Zn) 0,1-10 мг/л. Через 48 часов существенный выход калия из клеток зарегистрирован при концентрации ионов кобальта, меди и цинка 0,01 мг/л. Таким образом, выход калия из клеток регистрировался позже, чем полное ингибирование фототаксиса (рис. 1) в присутствии всех протестированных металлов.

Обсуждение

Флуоресценция хлорофилла широко используется для биотестирования как показатель активности фотосинтетического аппарата водных растений (Küpper et al., 1996; Drinovec et al., 2004), эпифлуоресцентная микроскопия нашла применение для детектирования комплексов хлорофилла с тяжелыми металлами *in vivo* (Küpper et al., 1998). Экспериментально доказано, что снижение флуоресценции хлорофилла под действием тяжелых металлов происходит в результате замещения ионов магния в молекуле хлорофилла «а» с образованием комплексов «тяжелый металл-хлорофилл» (TM-chl) (Küpper et al., 1998).

В отличие от флуоресценции, реакция фототаксиса хлоропластов используется для биотестирования редко и в основном для ряски (Цаценко, Малюга, 1988). Экспериментально показано, что перемещение хлоропластов в клетках ряски под действием света происходит в результате не только влияния света на фотосинтез и дыхание (Witztum et al., 1979). Движение хлоропластов в клетках включает участие актин-миозиновых белков, АТФ, фотосинтеза и других процессов (von Braun, Schleiff, 2007). Поэтому, по сравнению с эпифлуоресценцией, фототаксис более интегральная реакция.

Наши эксперименты показали, что достоверное снижение сигнала эпифлуоресценции

под действием тяжелых металлов происходит быстрее, чем ингибирование фототаксиса хлоропластов. Однако при летальных концентрациях металлов сигнал эпифлуоресценции снижается не до нулевого значения (рис. 2), в отличие от реакции фототаксиса (рис. 1). Одним из основных достоинств реакции фототаксиса с точки зрения биотестирования является, на наш взгляд, отсутствие необходимости контроля. Как известно, при благоприятных условиях фототаксис хлоропластов должен быть стопроцентным. И наоборот, летальный эффект сопровождается полным прекращением фототаксиса.

В табл. 1 приведены пороговые концентрации металлов, при которых наблюдалось полное ингибирование фототаксиса через разные временные интервалы. На основе полученных данных можно ранжировать металлы по степени их токсичности для элодеи. Так, через 1 час после начала воздействия цинк оказывает наиболее сильный токсический эффект (Mn<Ni<Co<Cu<Zn), через 24 часа эффекты цинка и меди сравнимы Mn<Ni<Co<Cu=Zn; через 48 часов становятся сравнимыми эффекты кобальта, меди и цинка (Mn<Ni<Co=Cu=Zn). Вероятно, токсический эффект от действия разных металлов достигал своего максимума с разной скоростью. На всем интервале воздействия марганец был наименее токсичным для элодеи. Интенсивность ингибирования эпифлуоресценции согласуется с результатами для фототаксиса. Однако для сигнала эпифлуоресценции не удается получить достоверных отличий из-за большого диапазона значений в пределах одного препарата. Другие исследователи также отмечают значительную разницу сигнала эпифлуоресценции у клеток элодеи на одном и том же препарате, что объясняется неравномерным распределением ионов металлов по поверхности растений

Таблица 1. Пороговые концентрации металлов, при которых наблюдается полное ингибирование фототаксиса хлоропластов элодеи через разные временные интервалы.

Время воздействия металла, час	Концентрация металла, мг/л				
	Mn	Ni	Co	Cu	Zn
1	>100	10	10	10	0,1
24	>100	1	0,1	0,01	0,01
48	1	0,1	<0,001	<0,001	<0,001
ПДК (Перечень..., 1999)	0,01	0,01	0,001	0,001	0,01

и, соответственно, разной реакцией клеток (Kürper et al., 1998).

Сравнение показывает (табл. 1), что при концентрациях металлов, равных ПДК для водоемов, имеющих рыбохозяйственное значение (Перечень..., 1999), полное ингибирование фототаксиса зарегистрировано для меди, кобальта и цинка. Концентрации тяжелых металлов, сравнимые с величинами ПДК (меди, цинка и марганца) и превышающие ПДК (никеля и кобальта), регистрируются в воде реки Енисей вблизи Красноярска (Анищенко и др., 2009).

Медь считается одним из наиболее токсичных металлов для водных растений. В экспериментах (Малёва и др., 2004) ионы меди вызывали более сильное снижение концентрации пигментов в листьях элодеи, чем ионы никеля. Однако в целом влияние этих металлов на фотосинтез было сравнимым. Ингибирование фотосинтеза элодеи под действием меди происходило быстрее и при меньших концентрациях, чем в присутствии цинка (Kürper et al., 1996). Однако позднее теми же авторами было экспериментально показано, что в клетках, погибших в присутствии меди, сигнал флуоресценции прекращается быстрее, чем в случае гибели клеток в присутствии цинка, т.к. комплекс Cu-chl не флуоресцирует, а комплекс Zn-chl сохраняет слабую флуоресценцию (Kürper et al., 1998). Отсюда могут происходить артефакты при оценке интенсивности фотосинтеза флуорес-

центными методами. В наших экспериментах ингибирование фототаксиса в присутствии ионов цинка происходило быстрее, чем в присутствии меди. Возможно, здесь также существует опосредованная связь с регуляторной ролью цинка в движении клеточных органелл (von Braun, Schleiff, 2007).

В наших экспериментах при концентрациях меди 10 мг/л наблюдалось полное ингибирование фототаксиса через один час. В экспериментах с элодеей канадской, проведенных Р.А. Мухамадияровым (1991), при концентрациях ионов меди того же порядка наблюдалось накопление малонового диальдегида – продукта перекисного окисления липидов в тканях растения, содержание которого в тканях через 1 час стабилизировалось на уровне в 5 раз большем, чем в контроле.

Перекисное окисление липидов приводит к нарушению проницаемости клеточных мембран. Одним из показателей нарушения целостности клеточных мембран является выход электролитов из клеток (ионов натрия и калия) (Brown, Wells, 1990). В экспериментах Р.А.Мухамадиярова (1991) при концентрации меди 50 мг/л достоверно регистрировался выход электролитов из клеток элодеи. При более низких концентрациях эффект был нестабильным. Аналогичный эффект наблюдался и в наших экспериментах. Существенный выход калия в воду у нас был через 1 час только при самой высокой кон-

центрации металлов (100 мг/л). При этом фототаксис был полностью ингибирован. При более низких концентрациях, приводящих к снижению флуоресценции и ингибированию фототаксиса, выход ионов калия происходил с существенным запаздыванием, по сравнению с двумя другими реакциями (рис. 4), что снижает информативность такого параметра, как выход калия, при относительно низких концентрациях металлов, приводящих к ингибированию фототаксиса и снижению сигнала флуоресценции. Результаты, полученные с помощью регистрации эпифлуоресценции, согласуются с реакцией фототаксиса хлоропластов на относительно коротком временном интервале. Поэтому обе реакции могут быть использованы для экспрессной оценки физиологического состояния элодеи и оценки отклика растения на присутствие тяжелых металлов в воде. Эксперименты показали, что снижение эпифлуоресценции хлорофилла происходит раньше, чем ингибирование фототаксиса хлоропластов (рис. 1, 3). Следовательно, эпифлуоресцен-

ция наиболее чувствительная тест-реакция из трех исследованных по скорости проявления эффекта.

Заключение

По чувствительности к тяжелым металлам исследованные тест-реакции можно ранжировать в порядке убывания скорости реакции: эпифлуоресценция хлорофилла > фототаксис хлоропластов > выход K^+ из клеток.

Фототаксис хлоропластов наряду с эпифлуоресценцией хлорофилла «а» листьев является приемлемой тест-реакцией для оценки токсичности тяжелых металлов для элодеи в силу своей интегральности и возможности выполнения экспресс-оценки.

По токсичности для фототаксиса хлоропластов в листьях элодеи, как наиболее интегральной реакции из трех исследованных, для используемых экспериментальных условий металлы можно ранжировать следующим образом в порядке усиления эффекта: $Mn < Ni < Co < Cu \leq Zn$.

Список литературы

- Анищенко О.В., Гладышев М.И., Кравчук Е.С. и др. (2009) Распределение и миграция металлов в трофических цепях экосистемы реки Енисей в районе г. Красноярск. Водные ресурсы. 36(5): 623-632
- Болсуновский А.Я., Муратова Е.Н., Суковатый А.Г. и др. (2007) Радиоэкологический мониторинг реки Енисей и цитогенетические характеристики водного растения *Elodea canadensis* // Радиационная биология. Радиоэкология. 47: 63-73
- Малёва М.Г., Некрасова Г.Ф., Безель В.С. (2004) Реакция гидрофитов на загрязнение среды тяжелыми металлами // Экология. 4: 266-272
- Мухамадияров Р.А. (1991) Влияние солей тяжелых металлов на клетки пресноводных растений: Дисс. ... канд. биол. наук. Томск, 174 с.
- Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. (1999) Изд-во ВНИРО, М., 304 с.
- Цаценко Л.В., Малюга Н.Г. (1998) Чувствительность различных тестов на загрязнение воды тяжелыми металлами и пестицидами с использованием ряски малой *Lemna minor* L // Экология. 5: 407-409.

Arts G.H.P., Belgers J.D.M., Hoekzema C.H., Thissen J.T.N.M. (2008) Sensitivity of submerged freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environ. Pollut.* 153 (1): 199-206.

Brown D.Y., Wells J.M. (1990) Physiological effects of heavy metals on the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Ann. Bot.* 66: 641-647.

Drinovec L., Drobne D., Jerman I., Zrimec A. (2004) Delayed fluorescence of *Lemna minor*: a biomarker of the effects of copper, cadmium, and zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72 : 896-902.

Esposit S., Cobianchi R.C., Sorbo S., Conte B., Basile A. (2007) Ultrastructural alterations and HSP 70 induction in *Elodea canadensis* Michx. exposed to heavy metals. *Caryologia* 60 (1-2): 115-120.

Horvat T., Vidakovic-Cifrek Z., Orescanin V., Tkalec M., Pevalek-Kozlina B. (2007) Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *Sci. Total. Environ.* 384 (1-3): 229-238.

Kahkonen M., Pantsar-Kallio M., Manninen P.G.K. (1997) Analyzing heavy metal concentration in the different parts of *Elodea canadensis* and surface sediment with PCA in two boreal Lakes in Southern Finland. *Chemosphere* 35: 2645-2656.

Knauer K., Mohr S., Feiler U. (2008) Comparing growth development of *Myriophyllum spp.* in laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. *Environ. Sci. Pollut. R.* 15 (4): 322-331.

Küpper H., Küpper F., Spiller V. (1996) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.* 47: 259-266.

Küpper H., Küpper F., Spiller V. (1998) *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynth. Res.* 58: 123-133.

Moody M., Miller J. (2005) *Lemna minor* growth inhibition test. In: Blaise C., Ferard J.-F. (eds.) *Small-scale freshwater toxicity investigations*, vol. 1. Springer, Netherlands, p. 271-298

von Braun S.S., Schleiff E. (2007) Movement of endosymbiotic organelles. *Curr. Protein Pept. Sc.* 8 (5): 426-438.

Witztum A., Posner H.B., Gower R.A. (1979) Phototactic chloroplast displacement in the photosynthetic mutant, *Lemna paucicostata* strain 1073. *Ann. Bot.* 44: 1-4.

Zotina T.A. (2008) The biomass of macrophytes at several sites of the upper reaches of the Yenisei River. *Journal of Siberian Federal University. Biology.* 1 (1): 102-108.

The Estimation of Toxicity of Heavy Metals for Aquatic Plant

Elodea Canadensis

Tatiana A. Zotina^{a,b},

Nicolai A. Gaevsky^b and Elena A. Radionova^b

^a*Institute of Biophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Science,
Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

^b*Siberian Federal University, Svobodny av., 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

*The effect of heavy metals (Cu, Mn, Co, Ni, Zn) of physiology of submerged aquatic plant *Elodea canadensis*: photosynthesis (chlorophyll epifluorescence); phototactic chloroplast displacement; plasmalemma permeability (K^+ - leakage), was estimated in laboratory experiments. On the sensitivity*

to heavy metals the tested parameters could be ranged as follows: chlorophyll epifluorescens > phototaxis of chloroplasts > K^+ - leakage from cells. According to the total inhibition for phototaxis of chloroplasts (as most integral and express parameter) the heavy metals could be ranged as follows: $Mn < Ni < Co < Cu \leq Zn$.

Keywords: chlorophyll epifluorescence, *Elodea canadensis*, heavy metals, K^+ leakage, phototaxis of chloroplasts, toxicity
