

Введение В последнее время, в связи с возрастающим загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами, изучение реакций растений на указанные вещества является важной экологической проблемой. Развитие методов очистки воздуха, почв и сточных вод и от ионов тяжелых металлов с помощью растений [1, 2] так же повышает интерес к выявлению механизмов взаимодействия растений с металлами. В силу ряда биологических особенностей растения вынуждены поглощать большинство тяжелых металлов. Поэтому вопрос о локализации металлов в растительном организме имеет большое значение при изучении их токсического действия и механизмов устойчивости. Разные органы, ткани и даже различные клетки внутри одной ткани растения по-разному накапливают металлы; их распределение в целом организме может быть крайне неравномерными. К настоящему моменту разработаны простые в использовании гистохимические методы, которые позволяют качественно, либо полуколичественно оценивать распределение, накопление и пути передвижения металлов в растениях [3-7]. Основа данных методов – образование окрашенных комплексов в клетках и тканях из исследуемого металла и специально подобранного к нему реагента. В сочетании с методами определения суммарного содержания металлов в органах растений гистохимические методы позволяют выстроить полную картину взаимодействия металла и растения. В связи с вышеизложенным, целью работы явилось изучение распределения тяжелых металлов (меди, никеля, кадмия) в листецах ряски для усовершенствования биоиндикационных способов оценки состояния природных водоемов, поскольку ряска широко используется в качестве биосорбента для очистки стоков от тяжелых металлов [8-11]. Объектами исследования являлись растения рода ряска: ряска крошечная *Lemna perpusilla* Torr. и ряска малая *Lemna minor* L. Идентификацию видов проводили по [12]. Ряска крошечная выращивалась на модифицированной среде Хоагганда в соответствии с [13]. Культивирование проводилось в нестерильных условиях, в стеклянной емкости при комбинированном освещении и температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Раз в неделю производилась замена питательной среды. В работе использовались сульфатные растворы: с концентрацией ионов  $\text{Ni}^{+2}$  - 0,1 и 0,3 мг/л; ионов кадмия - с концентрацией 0,3 мг/л и ионов меди - с концентрацией 0,3 мг/л приготовленные на дистиллированной воде. Для выявления локализации никеля в листецах ряски применялся 1%-ный раствор диметилглиоксима в 1,5 %-ном растворе гидроксида натрия на основе 0,05 М раствора натрия тетраборнокислого. Для выявления кадмия и свинца использовался раствор дитизона с концентрацией 0,5 мг/мл в смеси ацетон:дистиллированная вода в соотношении 3:1. Для повышения чувствительности реакции добавлялись 1-2 капли концентрированной уксусной кислоты [3]. Для выявления меди использовался раствор диэтилдитиокарбамата натрия. Реагент готовился следующим образом. В 1,5 %-ном растворе карбоната

натрия растворялась навеска диэтилдитиокарбамата натрия до массовой доли 0,1%. Раствор перемешивали, фильтровали. Готовый раствор хранился в склянке из темного стекла. Реактив пригоден для обнаружения меди в течение 1,5 недель. Концентрации реагента и растворителя подбирались исходя из свойств диэтилдитиокарбамата натрия [14]. Количественный анализ природной воды на содержание ионов меди, свинца, кадмия проводился с помощью вольтамперометрического анализатора «Экотест-ВА» по соответствующей методике. Количественный анализ природной воды на содержание ионов никеля проводился фотометрическим методом с диметилглиоксимом. Для проведения гистохимических исследований на предметное стекло наносились 3-4 капли соответствующего реагента. Листочки извлекались из раствора металла, жидкость с их поверхности удалялась фильтровальной бумагой. После этого растение помещалось на стекло в реагент верхней (дорзальной) стороной вверх. Через 3-5 минут листочек переворачивался нижней (вентральной) поверхностью вверх, накрывался покровным стеклом и анализировался на микроскопе «МИНИМЕД-502» при 40-, 100- и 400-кратных увеличениях. О присутствии металла в листочках судили по наличию и интенсивности окрашивания. Фотографии препаратов делали с помощью цифрового фотоаппарата. Масштаб определяли с помощью объект-микрометра отраженного света ОМО. Снимки обрабатывали на компьютере с использованием программы Gimp 2.8. Эксперимент по выявлению характера распределения металлов в органах и тканях ряски проводился следующим образом. 20 колоний ряски (материнский организм и 1-2 дочерних листочка) пересаживались из питательной среды в чашки Петри с раствором никеля с концентрацией катиона металла 0,3 мг/л. Растения для анализа отбирались через 15, 30 минут, 1-6 часов, а также каждые 24 часа в течение 7 суток после начала эксперимента. Исследования проводились при температуре  $22 \pm 2$  °С и комбинированном освещении. Контролем считались растения, культивированные на дистиллированной воде и обработанные по методике. Результаты и обсуждение Первоначально изучение распределения никеля в тканях ряски проводили в растворе NiSO<sub>4</sub> с концентрацией катионов 0,1 мг/л (ПДК никеля для питьевой воды [15]). Однако при такой концентрации в течение первых часов выявить накопление металла не удалось. Очевидно, чувствительность метода для этого недостаточна. Только после суток пребывания в растворе стало заметно окрашивание корня, вершины черешка, краевой области почечного кармашка и жилок. Контрольные растения, обработанные реагентом, окрашивание не показали. Для установления накопления никеля листочками в течение первых часов, концентрация металла была увеличена до 0,3 мг/л. В этих условиях сорбция (адсорбция) никеля ряской стала заметна уже через 15 минут после пребывания растения в растворе. На поверхности корня и черешке было обнаружено интенсивное окрашивание, особенно у основания корня. При выдержке ряски в растворе в течение 30 минут

происходило дальнейшее накопление никеля в указанных выше зонах и структурах растения. Особенно интенсивно процесс накопления металла происходил в зоне корня вблизи основания и в области корневого влагалища. В течение следующих 3 - 6 часов нахождения растений в растворе наблюдалось окрашивание поверхности самого листеца. По истечении суток наблюдалось окрашивание проводящей системы растения - жилок, а также клеток формирующих аэренхиму. Отмечено дальнейшее увеличение интенсивности окрашивания черешка, клеточных стенок и самих клеток основания корня и корневого влагалища (рис. 1). Рис. 1 - Локализация никеля в листеце после 1 суток пребывания в растворе металла. Стрелками указано присутствие никеля

На 2 - 3 сутки происходила диссоциация колоний, отмечались хлороз листецов и снижение тургора. В дальнейшем не было установлено существенных различий в картине распределения металла в листецах; она принципиально не отличалась от таковой после выдержки растения в растворе в течение суток

Накопление кадмия: уже после 15 минут выдержки ряски в растворе сульфата кадмия с концентрацией ионов  $Cd^{2+}$  0,3 мг/л наблюдалось достаточно интенсивное окрашивание поверхности корня и черешка. Характер распределения окраски свидетельствует о проникновении металла в клетки, тогда как никель в первые минуты адсорбировался на поверхностях клеток. По истечении суток происходило более интенсивное окрашивание и дальнейшее проникновение металла в ткани ряски (рис. 2). Рис. 2 - Локализация кадмия в листеце после 1 суток пребывания в растворе металла. Стрелками указано присутствие кадмия

При более длительной выдержке растения в растворе  $CdSO_4$  картина распределения окрашенных зон была схожей с никелем. При этом было отмечено снижение тургора и появление зон хлороза. Распределение меди в листецах ряски крошечной происходило так же, как и рассмотренных выше металлов (рис. 3). Полученные данные позволили предположить, что описанные гистохимические методы могут найти применение для совершенствования биоиндикационных способов оценки состояния природных пресных вод. Рис. 3 - Локализация меди в листеце после 1 суток пребывания в растворе металла. Стрелками указано присутствие меди

В связи с этим были проведены исследования по обнаружению ряда тяжелых металлов (никель, кадмий, свинец, медь) в природном водоёме с помощью ряски малой. Этот вид ряски был выбран как растение-биоиндикатор из-за своего широкого распространения. Для анализа отбирали пробы воды и ряски из небольшого ручья в черте города Энгельса Саратовской области, протекающего на расстоянии 15-20 метров от проезжей части автодороги и проводили количественные анализы воды на содержание тяжелых металлов. Полученные результаты количественных анализов показали, что в воде из природного источника содержится: 0,026 мг/л никеля, 0,001 мг/л кадмия, 0,035 мг/л свинца и 0,07 мг/л меди. Концентрации никеля и меди были ниже предельно допустимых для природных вод (0,1 мг/л

для никеля и меди [15]), а обнаруженные концентрации кадмия и свинца соответствовали или превышали ПДК (0,001 мг/л для кадмия и 0,03 мг/л для свинца). При обработке ряски диметилглиоксимом и диэтилдитиокарбаматом натрия окрашивания листецов не наблюдалось, но было отмечено интенсивное окрашивание корней после воздействия на ряску раствора дитизона (рис. 4). Здесь следует отметить, что дитизиновый метод пригоден как для выявления кадмия в растительных тканях, так и свинца [3]. Рис. 4 – Корень ряски малой, обработанный раствором дитизона. Стрелкой указано присутствие свинца

Заключение Таким образом, гистохимическими методами исследования выявлена локализация тяжелых металлов (меди, никеля, кадмия) в тканях ряски при времени выдержки растений в солевых растворах от 15 минут до 7 суток. Установлено, что наиболее интенсивное окрашивание листецов а, следовательно, и более быстрое поглощение металлов наблюдалась в зоне основания корня, корневого кармашка, черешка, и достигалось уже в первые часы пребывания растения в растворах. По истечении суток наблюдалось окрашивание проводящих систем и основной ткани листеца. Установлено, что скорость накопления листецами кадмия и меди из сульфатных растворов оказалась выше по сравнению с накоплением ионов никеля. Принципиальных отличий в распределении металлов в тканях и органах ряски не обнаружено. Проведенные анализы природной воды и исследования ряски малой, отобранные из естественного водоёма, показали, что простые гистохимические методы могут быть использованы для совершенствования биоиндикационных способов оценки состояния природных пресных вод.