



БИОЛОГИЯ

УДК 581.5.526.3

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТАЦИИ *WOLFFIA ARRHIZA* (LINNAEUS, 1771) HORKEL EX WIMMER К РАЗЛИЧНЫМ МИНЕРАЛЬНЫМ И БИОГЕННЫМ ПОЛЛЮТАНТАМ НА ПРИМЕРЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И АНТИБИОТИКОВ

А. А. Галицкая^{1,2}, Н. Ю. Селиванов², О. Г. Селиванова², О. И. Соколов²

¹Саратовский государственный университет

E-mail: ann.gal@mail.ru

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

E-mail: selivanov@ibppm.sgu.ru



Показана высокая устойчивость вольфии бескорневой *Wolffia arrhiza* (Linnaeus, 1771) Horkel ex Wimmer к поллютантам различной природы. Высказано предположение о перспективности исследований биоремедиационного потенциала данного представителя семейства Lemnaceae. Установлены некоторые особенности поверхности растений, объясняющие наличие дифференцированного ответа на действие ксенобиотиков.

Ключевые слова: ксенобиотики, рясковые, устойчивость.

**The Investigation of *Wolffia arrhiza* (Linnaeus, 1771) Horkel ex Wimmer
Adaptation to Different Mineral and Biogenic Pollutants
on the Example of Heavy Metals and Antibiotics**

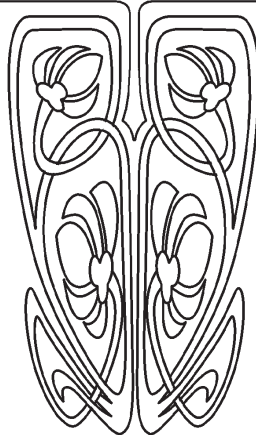
A. A. Galitskaya, N. Yu. Selivanov, O. G. Selivanova, O. I. Sokolov

The high tolerance of *Wolffia arrhiza* (Linnaeus, 1771) Horkel ex Wimmer plants was demonstrated. A perspective further investigations of the Lemnaceae family representative bioremediation potential is hypothesized. It has been established some plants surface characteristics (habits) which explain the presence of the distinctions of the plants reactions.

Key words: xenobiotics, duckweeds, tolerance.



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Экосистемы пресноводных водоемов наиболее сильно подвержены воздействию человеческой деятельности. Прямые стоки промышленного производства, коммунального и сельского хозяйства, неорганизованные стоки и аэротехногенные осадки, выпадающие на водосборы, в конечном итоге приводят к нарушению структуры и функционирования водных сообществ и ухудшению качества воды. В этих условиях особое значение приобретает способность водных экосистем к поддержанию гомеостаза. Среди его механизмов особое место занимают биологические процессы самоочистки воды, исследование которых составляет одну из важных задач современной экологии [1]. Самоочистка водоемов от природных и антропогенных загрязнений во многом определяется достаточно быстрыми процессами детоксикации и деградации поллютантов в ходе жизнедеятельности гидробионтов. Современные исследования показывают, что наряду с микрофлорой высшие цветковые растения также способны участвовать в процессах биодеструкции, и наиболее перспективными в этом отношении являются растения семейства рясковых (Lemnaceae), которые обладают высокой биопродуктивностью и широко распространены в



непроточных водоемах [2, 3]. В ряде работ показано, что представители данного семейства могут расти в водных системах с высокой степенью антропогенного загрязнения и аккумулировать ионы тяжелых металлов [4, 5].

Цель данной работы заключалась в исследовании устойчивости водных растений к воздействию ксенобиотиков различной природы для определения биоремедиационного потенциала фитобионтов, а также возможности их использования в биотестах при оценке загрязнения окружающей среды.

Материалы и методы

В работе использовали поверхностно стерилизованные растения вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza* (Linnaeus, 1771) Horkel ex Wimmer), которые характеризуются значительной морфологической редукцией – отсутствием корней, листьев при сохранении проводящей системы и функциональной тканевой организации. Растения выращивали на 1/10 жидкой среды Гамборга В-5, рН 7,0 при температуре 22 °С, искусственном освещении люминесцентными лампами (6000 лкс) при 16-часовом фотопериоде.

Для оценки устойчивости вольфии к различным ксенобиотикам готовили серии двукратных разведений исследуемых веществ, в 24- и 96-луночных планшетах. Инкубацию растений с поллютантами проводили в течение 7–21 сут в асептических условиях для исключения воздействия микрофлоры, которая, как известно, оказывает влияние на физиологическое состояние растений. Результаты вегетации растений оценивали визуально с использованием бинокулярной лупы по количеству зеленых и обесцвеченных растений и количеству новых почек. Основными параметрами были выбраны выживаемость растений и их способность к вегетативному размножению. При этом исходили из следующих положений: 1) параллельная оценка гибели и размножения позволяет проводить анализ токсического и ингибирующего действия исследуемых поллютантов, что значительно повышает чувствительность биотеста; 2) анализ времени задержки размножения (почкования) и его интенсивность при различных дозах исследуемых веществ позволяет оценить эффективность деградации или детоксикации исследуемого вещества.

Окрашивание поверхности растений рутениевым красным проводили методом, предложенным в работе J. Nafrén с соавт. [6]. Растения вольфии бескорневой промывали водой или обрабатывали растворами 30-, 40-, 60-, 70- или 96%-ного этанола, 40%-ного ацетонитрила, или 50–100% -ным раствором ацетона в течение от 30 мин до 8 ч, отмывали водой, затем помещали в 0,002%-ный

раствор рутениевого красного в воде. Инкубировали 0,5–2 ч. Отмывали трехкратной сменой воды. Образцы анализировали под бинокулярным микроскопом Zeiss SteREO Lumar V12 и под микроскопом Leica DMLB.

Результаты и их обсуждение

Соединения тяжелых металлов являются одними из широко распространенных загрязнителей окружающей среды, которые оказывают токсическое действие на все компоненты экосистемы. Анализ механизмов устойчивости водных растений представляет особый интерес не только с точки зрения определения устойчивости фитоценозов и гидроценозов в целом, но и с точки зрения эффективности фиторемедиационных процессов.

Нами была исследована резистентность вольфии к различным группам ксенобиотиков: солям тяжелых металлов (минеральные поллютанты) и антибиотикам (органические поллютанты).

Полученные данные показывают, что при сохранении общей устойчивости к высоким концентрациям ксенобиотиков растения вольфии проявляют разную чувствительность к поллютантам в пределах каждой исследованной группы. Это позволяет предполагать, что устойчивость может опосредоваться несколькими различными механизмами.

Среди исследованных металлов (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{4+} , Ag^+ , Hg^+) наибольшим токсическим эффектом обладают ионы меди (II), хотя ряд авторов относят их ко второй группе по степени токсичности в сравнении с ионами кадмия и свинца [7]. В нашем случае даже самая низкая из исследованных концентраций (60 мкМ) привела к заметному снижению выживаемости популяции (рис. 1). В то же время ионы Cd^{2+} даже в концентрации 250 мкМ не привели к гибели популяции, в этом случае скорость вегетативного размножения уравнивала гибель растений. При более низких концентрациях кадмия популяция к нему адаптировалась, при этом численность растений за время эксперимента (12 сут) увеличивалась в 2,5 раза. Аналогичная картина наблюдалась также после внесения солей других тяжелых металлов. При культивировании вольфии на среде, содержащей ионы Mn^{4+} и Ag^+ , наблюдалось изменение цвета культуры – побурение поверхности материнских растений. Молодые почки при этом оставались ярко-зелеными. Это может определяться либо различной чувствительностью вегетативных и меристематических тканей растений к химическим агентам, либо аккумуляцией и последующей детоксикацией ионов металлов различными тканями. Одним из механизмов детоксикации может быть изменение степени

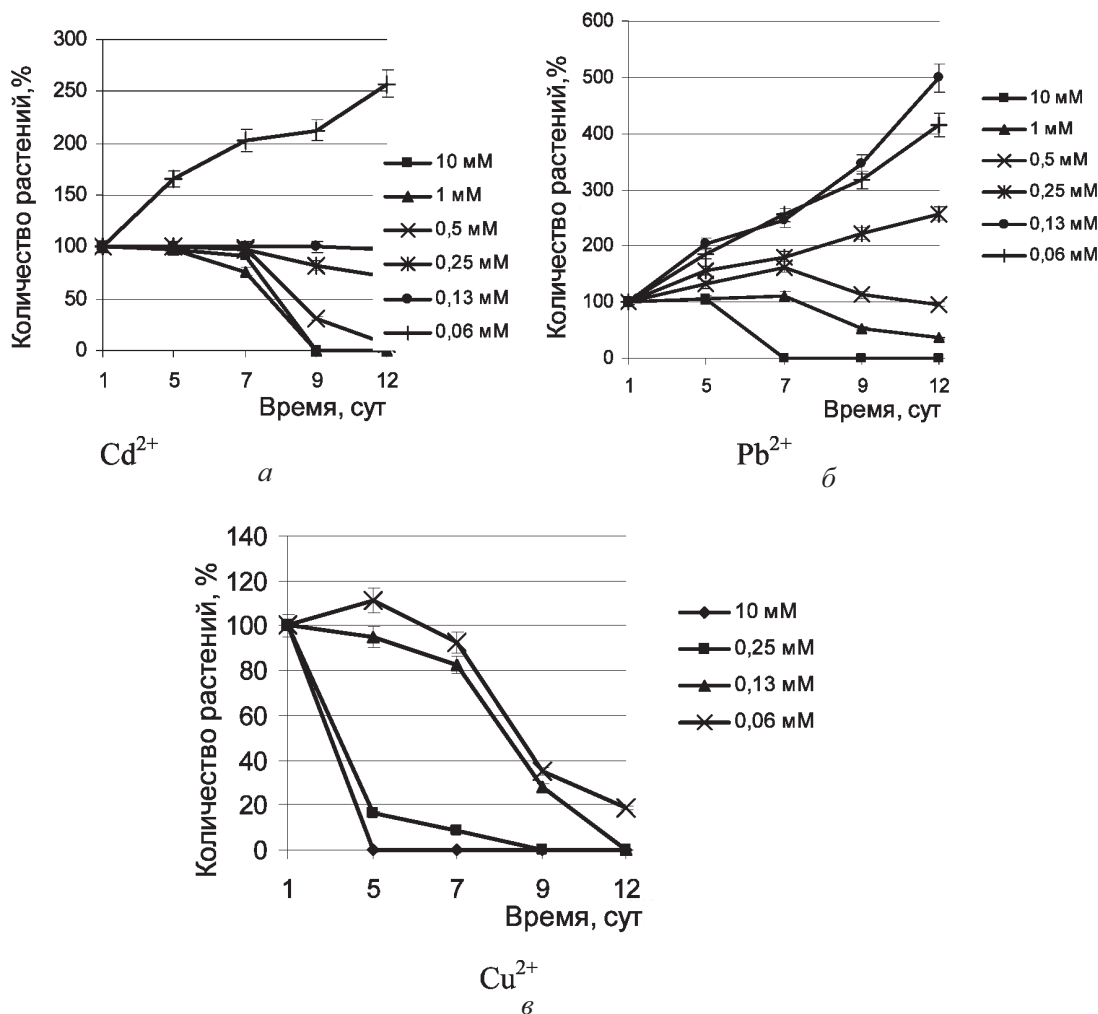


Рис. 1. Влияние различных концентраций ионов металлов на динамику численности популяции вольфии (за 100% принята масса инокулята)

окисления ионов, в частности при взаимодействии с полимерами и метаболитами, находящимися на поверхности растений и/или продуцируемыми ими в окружающую (культуральную) среду.

Другим аспектом исследования был анализ влияния различных концентраций органических поллютантов на рост и размножение растений вольфии бескорневой. Изучение антибиотикоустойчивости высших водных растений имеет важное значение по нескольким причинам. Водные ценозы с нарушенным экологическим равновесием, подвергшиеся антропогенному загрязнению, часто характеризуются высоким уровнем микробиологической контаминации. В подобных условиях многие микроорганизмы способны продуцировать вторичные метаболиты антибиотической природы, а также токсины, в том числе в процессе деградации поллютантов. К тому же в сельском хозяйстве, в частности в рыбоводстве, для предотвращения развития инфекционных заболеваний [8, 9] интенсивно применяются

антибиотики. Еще одним источником соединений антибиотической природы является интенсивное использование трансгенных сортов растений с встроенным синтезом защитных метаболитов различной природы [10].

В большинстве случаев попадание антибиотиков в водные ценозы затрагивает не только микробную, но и растительную компоненту. Это воздействие может осуществляться как опосредованно (через нарушение видового состава микрофлоры), так и непосредственно (за счет слабых барьерных свойств эпидермиса водных растений). Ввиду этого высшие водные растения являются удобным экспериментальным объектом для изучения особенностей коммуникативных отношений между компонентами экосистемы и формирования биоценозов.

В наших экспериментах растения показали более низкую устойчивость к большинству антибиотиков по сравнению с воздействием ионов тяжелых металлов. Возможно, это связано с тем,



что действие антибиотиков на растения чаще всего затрагивает функционирование органелл фотосинтетического и дыхательного аппаратов.

Полученные нами данные показывают, что устойчивость растений к антибиотикам возрастает в следующем порядке: ампициллин → канамицин → левомицетин → стрептомицин → амфотерицин → рифампицин. Выявлено, что полусинтетический антибиотик ампициллин, нарушающий синтез пептидогликана клеточных стенок бактерий, оказался наиболее токсичным по отношению к растениям вольфии, и даже самая низкая его концентрация в окружающей среде

оказывала ингибирующее действие как на рост, так и на размножение растений вольфии. При этом растения проявляли большую устойчивость к действию амфотерицина. При концентрации 13 мкг/мл наблюдалась выраженная адаптация к действию этого антибиотика, а более низкие концентрации уже не препятствовали росту и развитию растений. Антибиотик, затрагивающий биосинтетический аппарат бактерий на уровне синтеза белка, – рифампицин оказывал фитостатическое действие на популяцию водных растений. Полученные данные представлены на рис. 2.

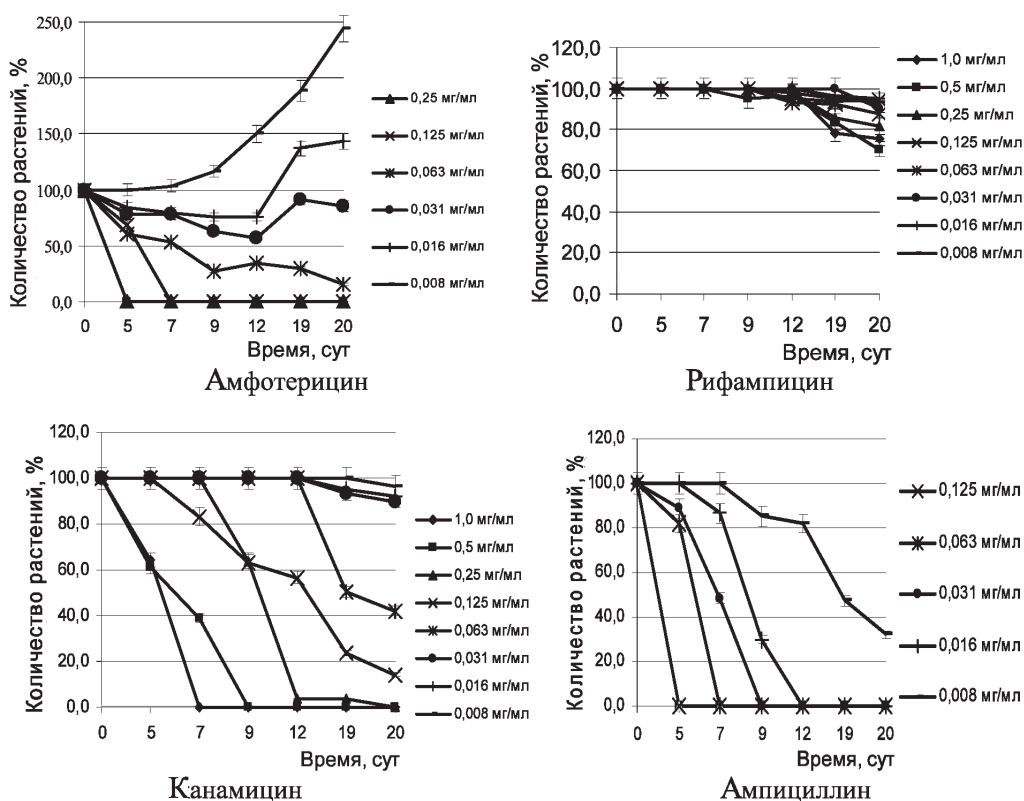


Рис. 2. Влияние различных концентраций антибиотиков на динамику численности популяции вольфии (количество растений выражено в процентах от первоначального)

Анализ динамики численности популяций при различных концентрациях антибиотиков показывает, что устойчивость в данном случае характеризуется различным временем задержки процесса размножения и предположительно определяется способностью растений к деградации исследуемого вещества. Динамика популяции в присутствии антибиотиков носит концентрационно-зависимый характер. При этом показано, что динамика основных параметров роста и развития популяции качественно изменяется в зависимости от действующей концентрации внесенных ксенобиотиков, что дает возможность их использования

в биотестах при оценке загрязнения окружающей среды.

Таким образом, длительное культивирование в присутствии исследованных веществ в большинстве случаев не приводило к гибели популяции, но имело выраженный ингибирующий эффект. Важно отметить, что устойчивость растений может определяться как метаболической деградацией в случае органических соединений, так и механизмами детоксикации неметаболизируемых ксенобиотиков (тяжелые металлы) за счет адсорбции на поверхности, аккумуляции и перевода в менее токсические формы.



Адсорбция тяжелых металлов на поверхности корней описана для многих наземных растений и является одним из первых и основных способов аккумуляции поллютантов подобного рода (так называемая биоаккумуляция посредством фитоэкстракции) [11]. Для гидрофитов показано, что накопление неорганических ксенобиотиков из окружающей среды происходит в основном на поверхности погруженной части побега [12]. Поскольку вольфия бескорневая характеризуется высокой степенью морфологической редукции, представляется интересным определить те зоны, которые непосредственно могут участвовать в процессе адсорбции.

Структура тканей растений, приспособленных к существованию в водных условиях, часто характеризуется особенностями состава и строения клеточных стенок, в частности наличием защитных пленок или кутикул. С целью исследования особенностей поверхности, обеспечивающих поверхностную адсорбцию веществ у растений вольфии, было проведено окрашивание целых растений красителем рутениевым красным, который широко используется в световой микроскопии для окрашивания полисахаридсодержащих компонентов различного происхождения [6].

В нашей работе гистохимическое окрашивание на содержание кислых полисахаридов тканей нативных растений *Wolffia arrhiza* дало отрицательный результат – краситель не проникал в клеточные стенки в отличие от тканей наземных растений. Окраске подвергались лишь отдельные локальные участки, связанные с наличием механических повреждений поверхности. Наличие участков с ограниченным проникновением красителя может быть вызвано присутствием в структуре клеточных стенок низкомолекулярного матрикса, предположительно гидрофобной природы, импрегнирующего полисахаридную основу клеточных стенок и ограничивающего взаимодействие полисахаридов с рутениевым красным. Эффективность связывания рутениевого красного в значительной степени возрастала после обработки вольфии органическими растворителями. Для удаления гидрофобной кутикулы использовали растворы ацетона, этанола и ацетонитрила с различным временем обработки. В результате было выявлено значительное количество пектиновых полисахаридов на поверхности и в тканях растений вольфии.

Наиболее интересные данные были получены при частичном удалении кутикулы путем предобработки 40%-ным раствором этанола с различной экспозицией. В этом случае было показано, что распределение кутикулы или ее свойства – толщина, а возможно и состав, – имеют

гетерогенный характер и различаются на отдельных участках поверхности. Причем количество и состав этого матрикса отражает функциональную дифференцировку клеток растений. Так, после обработки этанолом наиболее интенсивно окрашивались зоны, функционально связанные с активными биосинтетическими процессами – дорзальная фотосинтетическая пластинка и пролиферативная зона вегетативной почки (рис. 3). Детальный анализ распределения пектина в этих зонах показал, что наибольшее его количество локализуется вокруг устьиц.

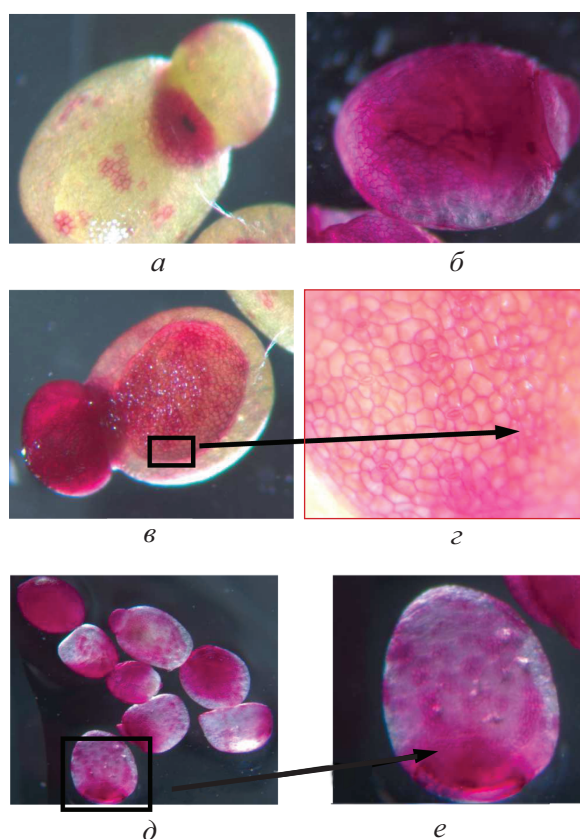


Рис. 3. Распределение зон окрашивания рутениевым красным поверхности вольфии бескорневой (обработка 40% этанолом, 2 ч): а, б – окрашивание участков с механическим повреждением поверхности растения; в, г – окрашивание дорзальной фотосинтезирующей пластинки; д, е – окрашивание меристематической зоны, связанной с формированием дочерней вегетативной почки

Таким образом, можно предположить, что эти участки подвержены действию внешних агентов в наибольшей степени вследствие их большей доступности, поскольку специфические защитные модификации структуры клеточных стенок затрагивают их в меньшей степени. Именно этим и можно объяснить наличие дифференцированного ответа на действие поллютантов – ксенобиотиков у материнских и дочерних растений (почек).



Полученные результаты показывают, что растения вольфии бескорневой обладают высокой резистентностью к воздействию поллютантов. Они характеризуются выраженным потенциалом адаптации к различным концентрациям токсических веществ, что проявляется при восстановлении интенсивности процесса вегетативного размножения растений. Важно отметить, что растения проявляют различную устойчивость к воздействию биогенных и минеральных ксенобиотиков; в частности, они эффективнее адаптируются к различным концентрациям солей тяжелых металлов, чем к действию низких концентраций антибиотиков.

Наличие качественных различий физиологического ответа на присутствие в среде поллютантов различной природы позволяет предположить наличие у растений нескольких различных механизмов, опосредующих их резистентность и адаптивный потенциал. В качестве одного из таких механизмов, предположительно обеспечивающих устойчивость растений вольфии бескорневой к солям тяжелых металлов, может выступать наличие в составе клеточных стенок большого количества пектиновых полисахаридов и поверхностного гидрофобного слоя (кутикулы). Пектиновые полисахариды способны интенсивно аккумулировать и задерживать ионы тяжелых металлов. Кроме того, наличие на поверхности растений выраженного гидрофобного слоя служит эффективным барьером для диффузии водорастворимых веществ.

Список литературы

1. *Остроумов С. А.* Биологический механизм самоочищения в природных водоемах и водотоках : теория и приложения // *Успехи совр. биол.* 2004. Т. 124, № 5. С. 429–442.
2. *Wang W.* Literature review on duckweed toxicity testing // *Environ. Res.* 1990. Vol. 52, № 1. P. 7–22.
3. *Ren L., Huang X. D., McConkey B. J., Dixon D. G., Greenberg B. M.* Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (fluoranthene, pyrene and naphthalene) to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3 // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1994. Vol. 28, № 2. P. 160–171.
4. *Charpentier S., Garnier J., Flaughnatti R.* Toxicity and bioaccumulation of cadmium in experimental cultures of duckweed, *Lemna polyrrhiza* L. // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1987. Vol. 38, № 6. P. 1055–1061.
5. *Dirilgen N., Inel Y.* Effects of zinc and cooper on growth and metal accumulation duckweed, *Lemna minor* // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1994. Vol. 53, № 3. P. 442–449.
6. *Hafrén J., Daniel G., Westermarck U.* The distribution of acidic and esterified pectin in cambium, developing xylem and mature xylem of *Pinus sylvestris* // *IAWA J.* 2000. Vol. 21. P. 157–168.
7. *Пастухова Н. Л.* Детоксикация тяжелых металлов у растений // *Проблемы экологии та охорони природи техногенного регіону.* 2008. Вып.8. С. 218–225.
8. *Ханайченко А. Н.* Микробиологические проблемы культивирования морских рыб на ранних стадиях развития (на примере камбалообразных) и пути их решения // *Morskyji ehkologichnuji zhurnal.* 2005. Vol. 4, № 2. P. 23–37.
9. *Шалютин Г. П.* Изучение возможности применения препарата «анавидин» для лечения и профилактики оодиноза // *Современные проблемы науки и образования.* 2009. № 6. URL: http://www.science-education.ru/pdf/2009/2009_06_3.pdf#page=17 (дата обращения: 07.12.2011).
10. *Gasdaska J. R., Spencer D., Dickey L.* Advantages of Therapeutic Protein Production in the Aquatic Plant *Lemna*. URL: <http://www.bioprocessingjournal.com> Mar/Apr 2003 (дата обращения: 07.11.2006).
11. *Прасад М. Н.* Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // *Физиол. раст.* 2003. Т. 50, № 5. С. 764–780.
12. *Варенко Н. И., Чуйко В. Т.* Роль высшей водной растительности в миграции марганца, цинка, меди и кобальта в Днепродзержинском водохранилище // *Гидробиол. журн.* 1989. Т. 25, № 4. С. 54–57.