

Оценка токсического действия ионов меди на ряску малую (*Lemna minor* L.) методом регистрации замедленной флуоресценции

© 2013. М. А. Субботин, ассистент, Ю. С. Григорьев, к.б.н., профессор,
Сибирский федеральный университет,
e-mail: submich@gmail.com, grig179@rambler.ru

Методом регистрации замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла изучено влияние температуры, интенсивности света, длительности экспозиции, состава и объёма среды на проявление токсического воздействия ионов меди на ряску малую. Установлено, что степень воздействия ионов меди усиливается при повышении температуры и уровня светового облучения ряски в период её экспозиции с токсикантом. Показано также, что относительный показатель интенсивности ЗФ позволяет выявлять токсическое действие ионов меди на ряску малую уже через несколько часов после внесения их в среду.

By means of chlorophyll delayed fluorescence we have investigated the influence of temperature, light intensity, duration of exposure, medium composition and volume on the development of toxic action of copper ions on duckweed. It is shown that the relative indicator of delayed fluorescence intensity allows registering the toxic action of copper ions on duckweed just a few hours after their introducing into the medium. It has been also noted that the degree of copper ions' influence increases with the rise of temperature and light intensity of duckweed during the period of its exposition with the toxicant.

Ключевые слова: замедленная флуоресценция хлорофилла, ряска малая (*Lemna minor* L.), токсичность ионов меди, интенсивность света, температура

Keywords: chlorophyll delayed fluorescence, duckweed (*Lemna minor* L.), toxicity, copper ions, light intensity, temperature

При биотестировании токсичности вод используются тест-организмы, относящиеся к различным звеньям природных экосистем и имеющие разный уровень организации. Из продуцентов чаще всего применяют одноклеточные водоросли, например, зелёные водоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* [1] и *Scenedesmus quadricauda* [2]. Ряска малая также является представителем продуцентов, но в отличие от водорослей имеет более высокую структурную организацию. В биотестировании она может отражать действие поллютантов на высшие водные растения, многие из которых активно аккумулируют токсические вещества в своей биомассе [3].

Использование ряски в качестве тест-организма обусловлено изменчивостью её морфологических признаков, которые можно оценить визуально по степени пожелтения, увядания листочков, хлорозам, некрозам и другим специфическим реакциям. Это позволяет без применения сложного оборудования получить представление о токсичности проб воды [4]. Вместе с тем учёт морфологических изменений несёт скорее качественную оценку и требует достаточно длительного времени для получения результата. Так, в соответствии с международным стандартом ISO/DIS 20079 опре-

деление ингибирующего действия токсикантов на рост популяции ряски малой как показателя токсического воздействия проводится в течение 7 суток [5]. При этом необходимость поддержания стерильности тест-культуры ряски во время столь длительного токсикологического эксперимента значительно усложняет процесс биотестирования вод.

Предложен также ряд экспрессных методов оценки негативного воздействия на ряску. Например, использование эффекта ингибирования фототаксиса хлоропластов при воздействии токсикантов [6], а также регистрация флуоресценции хлорофилла этих растений [7].

Методологический подход с использованием флуоресцентных методов позволяет наблюдать за объектом *in vivo* и количественно оценить состояние растений [7]. Источником оперативной информации о характере функционирования фотосинтетического аппарата может являться процесс замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла [8, 9]. На этой основе недавно была разработана оперативная методика биотестирования вод на микроводоросли хлорелла [10].

Целью данной работы явилось исследование действия ионов меди на растение «ряска малая» методом регистрации замедленной

флуоресценции и определения влияния внешних условий на проявление данного токсического эффекта.

Материалы и методы

Культура *Lemna minor* L. выращивалась в лаборатории на питательной среде Штейнберга (состав в мг/л: $KNO_3 - 350$; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O - 295$; $KH_2PO_4 - 90$; $K_2HPO_4 - 12,6$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 100$; $H_3BO_3 - 0,12$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O - 0,18$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O - 0,044$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O - 0,18$; $FeCl_3 \cdot 6H_2O - 0,76$; Titriplex III (EDTA) – 1,5) [5]. Емкости с растениями содержались в климатостате В-2, в котором поддерживалась постоянная температура 22 °С и обеспечивалось круглосуточное освещение люминесцентными лампами интенсивностью 3500–4000 люкс. В маточной культуре, как и в токсикологическом эксперименте, стерильность не поддерживалась. Чтобы содержать культуру тест-организма в относительной чистоте и исключить поглощение вносимых ионов меди биомассой сопутствующей микрофлоры и водорослей, ряску промывали водопроводной водой 1-2 раза в неделю (в том числе перед экспериментом) и переносили на свежую питательную среду.

Все опыты выполнялись на трёхлисточковых розетках ряски. В качестве модельного токсиканта использовался раствор сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Концентрация токсиканта дана в расчёте на ион меди (II). В каждую тестируемую пробу вносилось одно растение ряски.

Интенсивность миллисекундной замедленной флуоресценции регистрировали на флуориметре Фотон-10 при возбуждении тест-объекта импульсами синего света (480 ± 20 нм) длительностью 20 мсек. ЗФ регистрировалась с верхней стороны листочков в первые миллисекунды после всплеск возбуждающего света. Растения перед измерением ЗФ в течение 15 минут выдерживались в темноте.

В качестве показателя состояния фотосинтетического аппарата ряски использовали относительный показатель замедленной флуоресценции (ОПЗФ) – отношение уровней замедленной флуоресценции хлорофилла в их индукционных максимумах при возбуждении светом высокой (ЗФв) и низкой (ЗФн) интенсивности ($ОПЗФ = ЗФв / ЗФн$) [11]. Благодаря своей относительности ОПЗФ не зависит от размера растительного объекта и изменяется только при воздействии на его фотосинтетический аппарат.

Результаты

Известно, что действие токсикантов на тест-организм зависит не только от его концентрации в среде, но и от объёма самой среды, поскольку в условиях замкнутого экспериментального пространства его величина будет определять количество токсического вещества, приходящегося на один организм [12]. Поэтому при одной и той же концентрации токсиканта и биомассе тест-организма токсический эффект с увеличением объёма тестируемой среды должен до определённого предела возрастать.

Для установления оптимального объёма среды при биотестировании на ряске было изучено действие ионов меди на одну розетку при варьировании объёма растворов токсиканта в диапазоне от 4 до 500 мл.

Проведённые опыты с 20- часовой экспозицией показали (рис. 1), что в малом объёме (4 мл) токсическое действие на ряску в виде значительного снижения относительного показателя ЗФ наблюдалось только при очень высокой концентрации ионов меди (1 мг/л). В больших объёмах среды (20–500 мл) добавляемый токсикант вызывал снижение ОПЗФ при концентрации на порядок меньшей.

Как видно из приведённых данных (рис. 1), действие ионов меди возрастает только при увеличении объёма раствора токсиканта до 100 мл. При этом насыщение токсического воздействия наблюдается начиная с объёмов растворов в 20 мл. Поскольку использование больших объёмов проб вызывает определённые технические трудности в работе, то в дальнейшем при постановке острого токсикологиче-

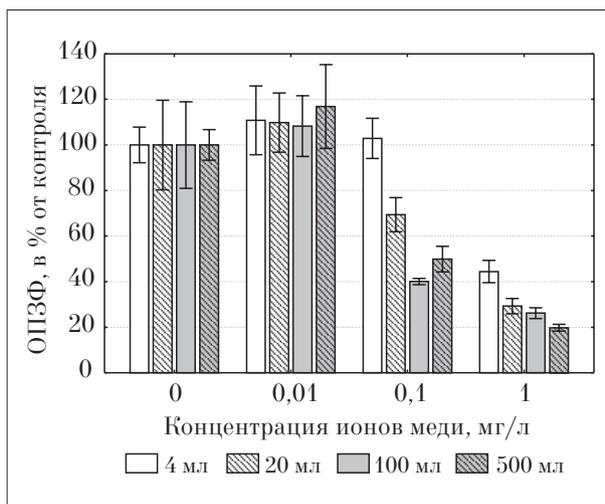


Рис. 1. Влияние разных объёмов растворов с ионами меди на ОПЗФ ряски малой (экспозиция 20 часов)

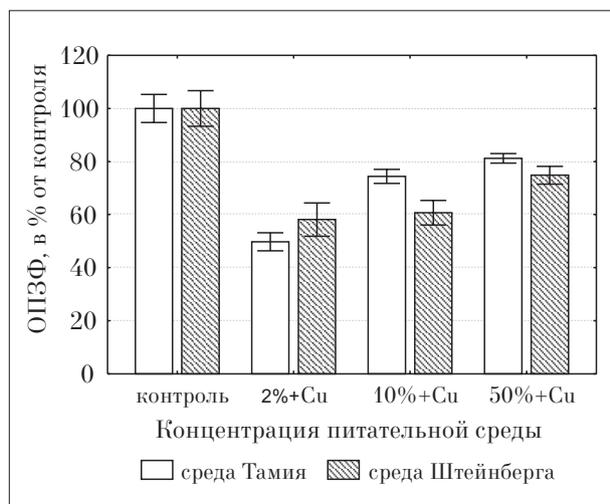


Рис. 2. Влияние ионов меди (0,125 мг/л) на величину ОПЗФ ряски на питательных средах различного разбавления (экспозиция 20 часов)

ского эксперимента нами был выбран в качестве оптимального объём среды в 50 мл. Токсикологические эксперименты с такими пробами воды проводились в специально разработанных устройствах УЭР-05, которые благодаря умеренному вращению проб обеспечивают поддержание требуемой температуры и равного светового облучения сразу для 18 ёмкостей с тест-организмами.

Состав водной среды оказывает существенное влияние на биодоступность вносимых токсикантов, в первую очередь, тяжёлых металлов (ТМ). В природных водах ТМ находятся преимущественно в трёх формах: в виде свободных (гидратированных) ионов, в составе комплексных соединений с неорганическими и, главным образом, органическими веществами различной молекулярной массы и хи-

мической природы, а также в составе взвешенных частиц [12 – 15]. При моделировании токсикологического эксперимента в лабораторных условиях среда, как правило, состоит только из растворённых неорганических солей, тем самым обладает минимальной связующей способностью. Однако в составе питательной среды Штейнберга имеется двунариевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты, обладающая сильными связующими способностями по отношению к ионам металлов. Кроме того, уровень общей минерализации среды может также оказывать существенное влияние на биодоступность токсикантов [14].

В связи с этим нами были проведены опыты по сравнению токсичности ионов меди для ряски на питательных средах Тамия и Штейнберга различного разбавления. По своему составу среда Тамия в 10 раз более минерализована, чем среда Штейнберга (8,75 г/л и 0,85 г/л соответственно). Эксперименты проводились с питательными средами, разбавленными до 2, 10 и 50%, в которые вносились ионы меди в концентрации 0,125 мг/л.

Результаты, представленные на рисунке 2, показывают, что при разбавлении обеих питательных сред до 2% токсический эффект ионов меди после 20-часового воздействия на ряску заметно увеличивался. При этом разбавление питательных сред дистиллированной водой не угнетало рост самих растений.

Учитывая большее воздействие модельного токсиканта на тест-организм в среде Штейнберга, разбавленной в 50 раз (2% содержание), этот вариант питательной среды был использован нами в дальнейших токсикологических исследованиях.

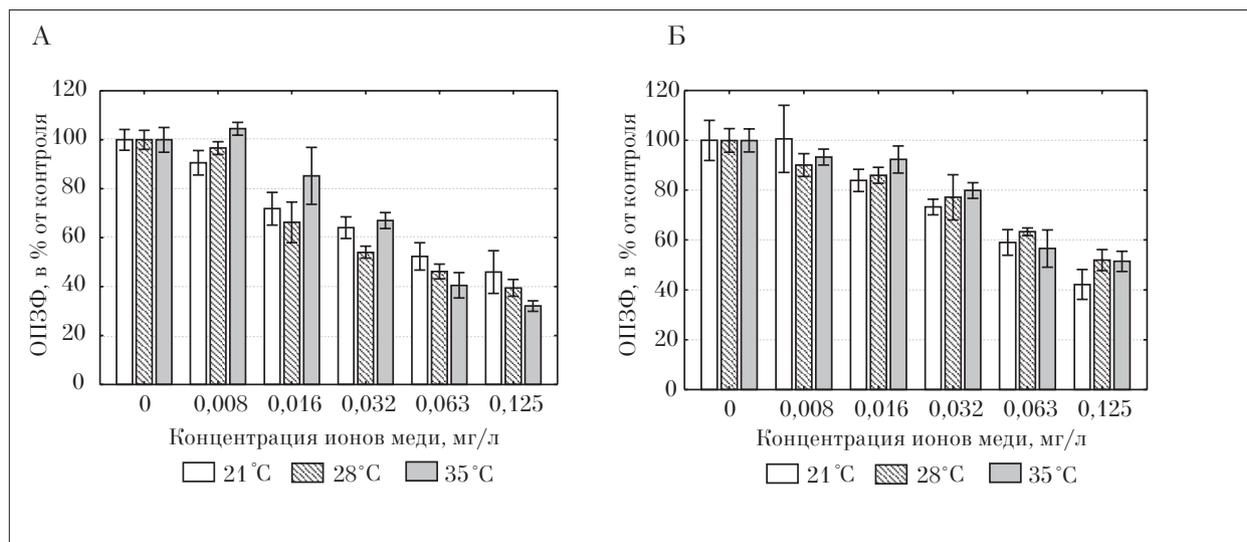


Рис. 3. Влияние температуры на ОПЗФ ряски при 4-часовой (А) и 24-часовой (Б) экспозиции

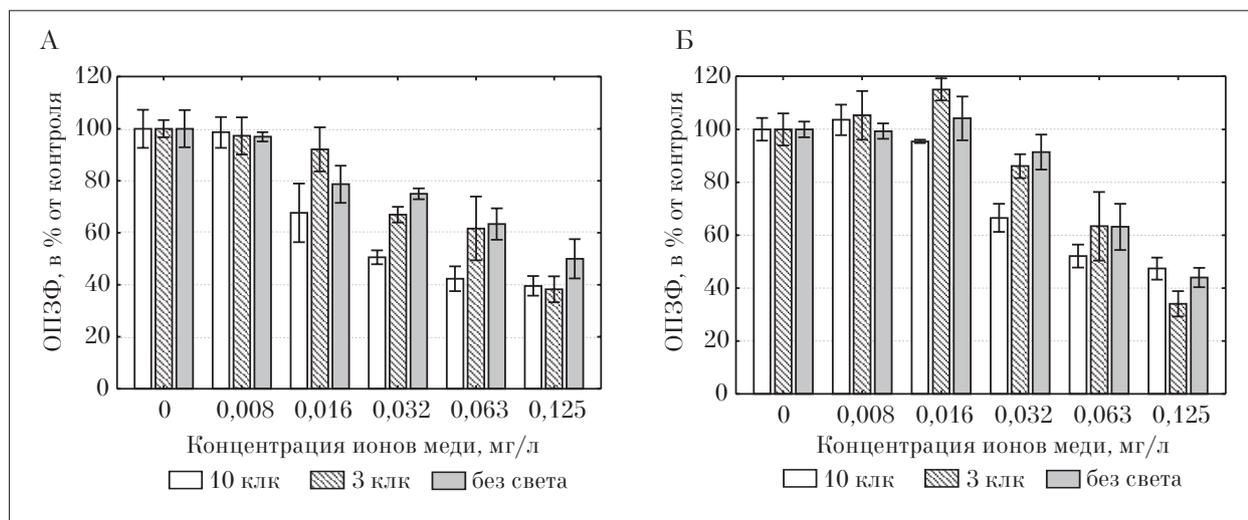


Рис. 4. Действие ионов меди на ОПЗФ ряски при различном световом облучении тест-объекта при 4-часовой (А) и 24-часовой (Б) экспозиции

Факторы внешней среды, такие, как температура, влияющая на рост и развитие самих растений [16], могут изменять и скорость поглощения ими токсических веществ. В связи с этим нами исследовано влияние температуры растворов на токсическое действие ионов меди на ряску при различных временных экспозициях.

Проведённые эксперименты показали, что при времени воздействия в 4 часа повышение температуры (28–35 °С) усиливало токсический эффект ионов меди (рис. 3).

С увеличением времени экспозиции до одних суток (рис. 3) величина ОПЗФ при действии всех исследованных концентраций ионов меди (0,008–0,125 мг/л) снижалась практически одинаково при всех трёх температурах (21, 28 и 35 °С) среды. Нивелирование температурного влияния может быть вызвано тем, что при повышенных температурах в условиях более длительного эксперимента токсический эффект ионов меди частично компенсируется ускорением роста в этот период самих растений ряски.

Другим внешним фактором, который оказывает влияние на растение и вследствие этого изменяет его реакцию на токсиканты, является уровень светового облучения растительного тест-организма [17]. С этой целью нами было изучено действие ионов меди на относительный показатель ЗФ ряски после экспонирования при различных интенсивностях света.

Исследования показали (рис. 4), что в условиях более высокого (до 10000 лк) уровня светового облучения растений токсическое воздействие ионов меди возрастало. Эффект отмечался как при 4-часовой, так и 24-часо-

вой экспозициях. Возможно, что высокая интенсивность света, активизируя фотоассимиляционную активность растения, способствует и большему поглощению токсиканта из среды. Не исключено также, что при высоком уровне светового облучения растений может развиваться процесс фотоингибирования, вызывающий повреждение фотосинтетического аппарата [18]. В присутствии ионов меди количество таких повреждений существенно возрастает [19].

Таким образом, замедленная флуоресценция, в виде её относительного показателя, позволяет выявлять токсический эффект ионов меди по отношению к ряске малой уже через несколько часов после внесения их в среду. При этом действие ионов меди на ряску усиливается при повышении температуры, интенсивности светового облучения и при разбавлении питательной среды.

Литература

1. Katsumata M., Koike T., Nishikawa M. Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* // Water Research. 2006. № 40. P. 3393–3400.
2. Жмур Н.С., Орлова Т.Л. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по измерению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. М.: АК-ВАРОС, 2007. 48 с.
3. Mikryakova T.F. Accumulation of Heavy Metals by Macrophytes at Different Levels of Pollution of Aquatic Medium // Water Resources. V. 29. № 2. 2002. P. 230–232.
4. Паценко Л.В., Малюга Н.Г. Чувствительность различных тестов на загрязнение воды тяжёлыми ме-

таллами и пестицидами с использованием ряски малой *Lemna minor* L. // Экология. 1998. № 5. С. 407–409.

5. ISO/DIS 20079, Water quality – determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. ISO TC 147/SC 5/WG 5, 2004.

6. Ломагин А.Г., Ульянова Л.В. Новый тест на загрязнённость воды и использование ряски *Lemna minor* L. // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 2. С. 327–328.

7. Гольд В.М., Гаевский Н.А., Григорьев Ю.С., Гехман А.В. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла. Учебное пособие. Красноярск: Изд-во КрасГУ, 1984. 84 с.

8. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. № 4. С. 7–13.

9. Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J. Delayed fluorescence in photosynthesis // Photosynthesis research. 2009. V. 101. P. 217–232.

10. Григорьев Ю.С., Стравинскене Е.С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод и отходов по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). ПНД Ф Т 14.1:2.4.16-09 16.1:2.3.3.14-09. Москва. 2009. 48 с.

11. Григорьев Ю.С., Фуряев Е.А., Андреев А.А. Способ определения содержания фитотоксических веществ. Патент № 2069851. Бюлл. изобр., №33 от 27.11.96.

12. Брагинский Л.П., Линник П.Н. К методике токсикологического эксперимента с тяжёлыми металлами на гидробионтах // Гидробиологический журнал. Т. 39. 2003. № 1. С. 92–104.

13. Будников Г.К. Тяжёлые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 5. С. 23–29.

14. Greger M., Kautsky L., Sandberg T. A tentative model of Cd uptake in *Potamogeton pectinatus* in relation to salinity // Environmental and Experimental Botany. 1995. V. 35. № 2. P. 215–225.

15. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Ленинград: Гидрометеоиздат, 1986. 272 с.

16. Fritioff A., Kautsky L., Greger M. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submerged plants // Environmental Pollution. 2005. № 133. P. 265–274.

17. Artetxe U., Garcia-Plazaola J.I., Hernandez A., Becerril J.M. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd // Plant Physiology and Biochemistry. 2002. № 40. P. 859–863.

18. Marschner P. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press. 1995. 889 p.

19. Польшов В.А., Маторин Д.Н., Вавилин Д.В., Венедиктов П.С. Действие низких концентраций меди на фотонгибирование фотосистемы II у *Chlorella vulgaris* (Beijer) // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 5. С. 754–759.