

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Саратовский государственный технический
университет имени Гагарина Ю.А.»

На правах рукописи

ВАЛИЕВ РЕНАТ ШАВКАТОВИЧ

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИИ
И ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАСТЕНИЙ РОДА РЯСКА *LEMNA L.*
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ПРОЦЕССЕ
ФИТОРЕМЕДИАЦИИ ВОДЫ**

Специальность 03.02.08 – экология
(биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Ольшанская Любовь Николаевна,
доктор химических наук, профессор

Саратов – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	10
1.2. Фиторемедиационные технологии в очистке загрязненных стоков.....	10
1.2. Растения семейства рясковых Lemnaceae.....	15
1.3. Биоэлектrogenез растений.....	23
1.3.1. Импульсная электрическая активность у высших растений	27
1.3.2. Биоэлектrogenез растений рода <i>Lemna</i> L.	33
1.4. Гистохимические исследования	36
1.4.1. Особенности гистохимических исследований распределения металлов в растениях	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1.1. Объекты исследования	50
2.1.2. Приготовление рабочих растворов солей тяжёлых металлов	51
2.1.3. Приготовление рабочих растворов для гистохимических исследований	52
2.1.4. Приготовление препаратов для микроскопирования	52
2.1.5. Стерилизация листецов ряски малой	52
2.1.6. Приготовление растворов для изучения анатомии листецов ряски ..	54
2.2. Методы исследования.....	54
2.2.1. Воздействие внешних физических факторов.....	54
2.2.2. Микроструктурные исследования.....	56
2.2.3. Измерение размеров листецов и площадей групп ряски с помощью программы ImageJ	57
2.2.4. Оценка степени хлороза листецов ряски по фотографиям.....	58
2.2.5. Изучение анатомии листецов ряски	60
2.2.6. Влияние тяжелых металлов, магнитного поля и УФ-излучения на проницаемость мембран листецов ряски кондуктометрическим методом.....	60
2.2.7. Методика измерения поверхностного потенциала листецов ряски ..	61
2.2.8. Проведение количественного анализа природной воды.....	61
2.2.9. Статистический анализ результатов	63
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (КАДМИЯ, МЕДИ И НИКЕЛЯ) ВЕГЕТАТИВНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ И МОРФОЛОГИЮ РАСТЕНИЙ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ.....	64
3.1. Влияние кадмия, меди и никеля на вегетативное размножение ряски крошечной.....	65
3.2. Оценка изменения общей площади популяции ряски	67
3.3. Влияние кадмия, меди и никеля на линейные размеры листецов ряски крошечной.....	69
3.4. Зависимости между степенью токсичности металлов для ряски крошечной и их физико-химическими свойствами.....	72

ГЛАВА 4. ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛОКАЛИЗАЦИИ МЕТАЛЛОВ В ЛИСТЕЦАХ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ.....	76
4.1. Подбор реагента для гистохимического выявления меди в растительных тканях.....	76
4.2. Локализация ионов меди в листецах ряски крошечной и их реакции на металл	77
4.3. Локализация ионов никеля и кадмия в листецах крошечной и их реакции на металлы.....	82
4.4. Определение тяжелых металлов в водных средах с использованием гистохимических методов	86
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ЛИСТЕЦОВ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ	88
5.1. Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в растворах меди с разным анионным составом.....	88
5.2. Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в ацетатных растворах меди с разной концентрацией металла	91
5.3. Влияние УФ-излучения на динамику поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в присутствии ионов меди	93
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ И УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ И ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ	95
6.1. Влияния постоянного магнитного поля на рост ряски крошечной	95
6.2. Влияния УФ-излучения на рост ряски крошечной.....	95
6.3. Влияния магнитного поля и УФ-излучения на проницаемость плазматических мембран ряски крошечной.....	98
ГЛАВА 7. РЕГЕНЕРАЦИЯ РЯСОК ПОСЛЕ ПРЕБЫВАНИЯ В РАСТВОРАХ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ИХ СМЕСЕЙ С КАЛЬЦИЕМ	101
7.1. Регенерация после растворов солей никеля и смесей никель:кальций ..	102
7.2. Регенерация после растворов солей кадмия и смесей кадмий:кальций .	109
7.3. Регенерация после растворов солей меди и смесей медь:кальций	109
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	119
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ В КАЧЕСТВЕ ФИТОРЕМЕДИАЦИОННОГО АГЕНТА.....	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований. В последнее время загрязнение вод приобретает характер глобальной экологической угрозы и все сильнее привлекает внимание ученых всего мира. Водные объекты являются одними из главных «хранилищ» загрязнителей так как промышленные и бытовые стоки содержат широкий ряд токсичных веществ и соединений, которые губительно действуют на живые организмы и здоровье человека. Среди них могут быть: удобрения, красители, пестициды, тяжелые металлы (ТМ), радионуклиды и др. [1-3]. В связи с этим возрастают требования к методам очистки стоков. Обычно применяемые физико-химические методы эффективны, но достаточно дороги и, кроме того, могут создавать дополнительную нагрузку на водоёмы.

Фиторемедиационные технологии очистки и доочистки сточных вод, основанные на использовании растений в сообществе с микроорганизмами, представляют в экологическом плане эффективное дополнение, а в некоторых случаях, – альтернативу традиционным технологиям. Фиторемедиация в среднем в 10 раз дешевле физико-химических методов очистки, процесс извлечения поллютантов происходит непосредственно на месте их локализации *in situ*. Источником энергии для процесса, как правило, является Солнце. Наиболее распространенными видами растений являются тростник, рогоз и камыш, элодея, водный гиацинт (эйхорния) и различные представители семейства рясковых [3].

Степень разработанности темы исследования. К настоящему времени динамика поглощения различных тяжелых металлов рясковыми, а также влияния различных факторов на процессы поглощения изучены достаточно полно [4-12]. Однако особенности взаимодействия рясковых с металлами на морфологическом уровне исследованы недостаточно. Кроме этого, эффективные и простые в использовании гистохимические методы исследования локализации металлов в органах и тканях рясковых в процессе фиторемедиации не адаптированы и применяются крайне редко. Имеется также сравнительно небольшое количество работ, в которых изучено

восстановление рясковых после действия различных токсикантов, в том числе, тяжелых металлов [13].

Цель работы – установить влияние ряда тяжелых металлов (кадмия, меди, никеля), постоянного магнитного поля и ультрафиолетового излучения на размножение, морфологию, электрические свойства растений рясок рода *Letna* L., охарактеризовать распределение тяжелых металлов в их тканях и органах, возможность регенерации растений.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Изучить влияние природы и концентрации ионов тяжелых металлов ИТМ: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , длительности воздействия постоянного магнитного поля и ультрафиолетового излучения на параметры вегетативного размножения ряски крошечной, а также изменение её морфологии.

2. Изучить особенности локализации и накопления тяжелых металлов листецами ряски крошечной. Разработать и апробировать новый реагент для гистохимического анализа содержания ионов меди в тканях листецов ряски.

3. Исследовать воздействие УФ, природы и концентрации анионов, совместного влияния ионов меди и УФ на динамику поверхностных потенциалов (электрических свойств) листецов ряски крошечной в процессе фиторемедиации воды.

4. Изучить процессы регенерации рясок малой и крошечной после пребывания в простых (соли меди, никеля и кадмия) и смешанных растворах (с кальцием) металлов различной концентрации.

Научная новизна работы. Установлено, что ТМ (кадмий, медь, никель) в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/л оказывают влияние как на скорость вегетативного размножения, так и морфологию ряски крошечной. Впервые показано, что у листецов, растущих на среде с никелем, развивается характерная деформация – образование зон некроза в средней части и у основания. Данный признак может служить индикатором присутствия в среде Ni^{2+} при биотестировании или биоиндикации.

Установлена возможность применения гистохимических методов анализа для определения тяжелых металлов в тканях и органах растений рясок крошечной и малой. Впервые для селективного выявления ионов меди в растительных тканях предложен карбаматный реагент.

Впервые проведена оценка влияния концентрации и анионного состава солей меди, УФ-облучения, а также сочетанного воздействия ионов меди и УФ на изменение поверхностного потенциала (электрических свойств) ряски крошечной в процессе фиторемедиации воды. Показано, что ход поверхностных потенциалов в растворах меди характеризуется многофазной динамикой.

Показано, что листецы ряски крошечной сохраняют способность к регенерации после пребывания в течение 5 суток в растворах никеля при концентрациях 1 и 10 мг/л, а малой, при тех же условиях, в растворах никеля и меди.

Теоретическая и практическая значимость результатов работы. Установлено, что различные ткани и отделы листецов ряски крошечной обладают разной чувствительностью к тяжелым металлам, что важно для понимания механизмов устойчивости рясковых к поллютантам. Выявлено, что клеточные стенки корней и листецов играют важную роль в процессах накопления рясковыми ТМ, дополняя внутриклеточные механизмы накопления и детоксикации, обеспечивая, в отношении некоторых металлов, свойство гипераккумуляции. Показана возможность использования гистохимических методов для обнаружения тяжелых металлов - экотоксикантов в органах и тканях растений рясок рода *Lemna* L. Исследование по способности рясок регенерировать после пребывания в растворах ТМ может рассматриваться как своего рода селекционная работа, направленная на отбор среди популяций рясок по признаку устойчивости к тяжелым металлам.

Полученные результаты могут быть использованы в теории и технологии очистки стоков, загрязненных тяжелыми металлами, методами фиторемедиации.

Разработанные научные положения диссертации внедрены и используются в учебном процессе ЭТИ (филиал) СГТУ имени Гагарина Ю.А. по дисциплинам: «Экология», «Химия окружающей среды», «Промышленная экология», при курсовом и дипломном проектировании.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Замедление скорости вегетативного размножения ряски крошечной в присутствии в среде ионов тяжелых металлов (кадмия, меди и никеля) в определенных концентрациях, сопровождающееся уменьшением размеров отдельных листецов. Листецы ряски крошечной дифференцировано реагируют и накапливают тяжелые металлы в различных тканях.

2. Действие УФ-излучения, которое обладая схожими чертами с действием тяжелых металлов, способствует замедлению процесса размножения ряски крошечной, вызывая деформацию листецов и диссоциацию групп. ПМП не оказало существенного влияния на вегетативное размножение и морфологию растения.

3. Многофазный характер изменения поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в растворах солей меди, определяемый величиной концентрации катиона металла и действием УФ-излучения, влияющего на проницаемость мембран.

4. Результаты, свидетельствующие о способности растений рясок рода *Lemna* L. к регенерации после продолжительного пребывания (5 суток) в растворах солей поллютантов (никеля и меди) в концентрациях до 2-х порядков превышающих величины ПДК (0,1 мг/л для никеля и 1 мг/л для меди) в питьевых водах.

Соответствие паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют шифру специальности 03.02.08 – экология. Экология - наука, которая исследует структуру и функционирование живых

систем (популяции, сообщества, экосистемы) в пространстве и времени в естественных и измененных человеком условиях. Предмет экологии: совокупность живых организмов (включая человека), образующих на видовом уровне популяции, на межпопуляционном уровне – сообщество (биоценоз), и в единстве со средой обитания – экосистему (биогеоценоз). Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности 03.02.08 – экология, конкретно – факториальной экологии.

Реализация результатов работы. Работа проводилась в соответствии с основными научными направлениями ФГБОУ ВО СГТУ имени Гагарина Ю.А. 14 В. 03 «Разработка энергосберегающих технологий, способов контроля, очистки и обеззараживания воды, почвы, переработки и утилизации техногенных образований и отходов в товары народного потребления» и по госзаданию Министерства образования и науки РФ «Кинетические закономерности и механизмы процесса извлечения поллютантов из сточных вод и почв с помощью природных и модифицированных сорбентов и энергии внешних физических полей» (№ госрегистрации 114112570078).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена применением современных методов исследования, гостированных методик, а также адекватным использованием статистических методов обработки данных и компьютерных пакетов программ.

Результаты работы апробированы на международных и всероссийских научных конференциях: Международных научно-практических конференциях: «Экология: образование, наука, промышленность и здоровье» (Белгород, 2011); «Региональные экологические проблемы» (Барнаул, 2012); Международных молодежных конференциях «Экологические проблемы горно-промышленных регионов» (Казань, 2012); «Человек, экология, культура: современные практики и проблемы» (Саратов, 2013); Vědecko-Praktická Konference (Praha, 2014); Международной конференции «Oekologische, technologische und rechtliche Aspekte der Lebensversorgung» (Hannover, 2013); Всероссийской заочной научно-практической конференции «Устойчивое

развитие инновационного общества: экология, власть, общественность» (Саратов, 2013).

Публикации работы. По теме диссертационной работы опубликовано: 21 статья, включая 6 статей в журналах из перечня ВАК, две статьи в зарубежных изданиях, шесть статей в журналах и сборниках.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 75 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из введения, семи глав, выводов, списка литературных источников из 199 наименований.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.2. Фиторемедиационные технологии в очистке загрязненных стоков

В последнее время возросшие темпы урбанизации, роста численности населения и промышленности чрезвычайно сильно влияют на поступление опасных веществ в воды Мирового океана. Именно водные объекты являются одними из главных «хранилищ» загрязнителей напрямую или косвенно. Промышленные и бытовые стоки содержат широкий ряд токсичных веществ и соединений, которые губительно действуют на живые организмы и здоровье человека. Среди них могут быть: удобрения, красители, пестициды, антипирены, тяжелые металлы, радионуклиды, мышьяк и др. [2-1]. В связи с этим возрастают требования к методам очистки стоков. Обычно применяемые физико-химические методы эффективны, но достаточно дороги и, кроме того, могут создавать дополнительную нагрузку на водоёмы [1]. Фиторемедиационные технологии и методы представляют в этом отношении эффективное дополнение, а в некоторых случаях, – альтернативу традиционным технологиям.

В целом под фиторемедиацией понимают использование растений, а так же микроорганизмов для очистки загрязненных почв, грунтовых и сточных вод. Живые организмы извлекают, накапливают, хранят/деградируют загрязнители, используя особенности своих анатомических и физиологических систем. Фиторемедиация в среднем в 10 раз дешевле физико-химических методов очистки, процесс извлечения поллютантов происходит непосредственно на месте их локализации *in situ*. Источником энергии для процесса, как правило, является Солнце [3].

Самыми распространенными видами растений для очистки загрязненных вод являются рдесты (гребенчатый и курчавый), тростник, рогоз, камыш, ряска, элодея, эйхорния и др.

Установлено, что водные растения могут очищать воду от радиоактивных элементов, таких как, уран радий и торий. Тростник на загрязненных сточными водами участках аккумулирует к концу вегетации в

4 раза больше железа, в 100 раз – кальция; в 1,2 – магния; в 1,5 – азота; в 1,3 – фосфора, чем растения того же тростника, не подвергающихся влиянию сточных вод. Заросли тростника площадью 1 га тростника способны накопить в своей биомассе до 6 т различных веществ, в том числе калия – 860 кг, азота – 170 кг, фосфора – 120 кг, натрия – 450 кг, серы – 280 кг, кремния – 3 700 кг. Камыш извлекает Mn, ирис – Ca, осока – Fe, ряска – Cu. Процесс минерального питания водных растений обеспечивает поглощение и утилизацию значительного количества веществ и соединений [3].

В зависимости от особенностей фиторемедиационных процессов, от преимущественной локализации загрязнителей в органах и тканях растений-ремедиантов, выделяют следующие виды фиторемедиации: фитоэкстракцию, фитостабилизацию, ризофилтрацию и фитоволатилизацию [4-5, 14].

В процессе фитоэкстракции происходит извлечение загрязнителя (например, тяжелого металла) корнями растения и транспортирование его в побеги. Впоследствии растения, накопившие/трансформировавшие поллютант, собираются, чем достигается очистка загрязненного участка [5]. Именно фитоэкстракцию считают основным инструментом для очистки почв, содержащих большие количества тяжелых металлов, радионуклидов [14].

Одним из главных препятствий для развития технологий фитоэкстракции является низкая биодоступность тяжелых металлов в почвах. Например, свинец, один из самых важных поллютантов окружающей среды, находится в форме малорастворимых соединений в обычном диапазоне почвенного pH. Для повышения растворимости металлов и, следовательно, доступности для растений-аккумуляторов применяют хелаторы. Показано, что этилендиаминтетрацетат (ЭДТА) повышал эффективность экстракции кадмия, меди, никеля, свинца и цинка из почв. ЭДТА в почве образовывал растворимые комплексы с металлами, а растения поглощали эти комплексы и накапливали в надземной части [14]. В данном случае имеет место использование и некоторая модификация естественных механизмов: известно, что некоторые металлы, в частности, железо, извлекаются

растениями из почвы именно в виде комплексов с хелаторами (фитосидерофорами – мугеновой кислотой и ее производными), которые секретируются в почвенный раствор корнями [14-16].

Фитостабилизация применяется для первичной очистки почв и осадков. Метод основана на способности корней растений ограничивать подвижность, биодоступность загрязнителя в почве. Он эффективен, если необходима быстрая иммобилизация контаминанта, защита грунтовых и поверхностных вод.

Ризофилтрация используется для очистки грунтовых, поверхностных и сточных вод с небольшими концентрациями загрязнителей. Для ризофилтрации используются как наземные, так и водные растения, которые абсорбируют, концентрируют вещества корнями.

В процессе фитоволатилизации происходит извлечение контаминантов, превращение их в летучие формы и транспорт их в атмосферу посредством транспирации. Чаще всего таким способом достигается очистка ртути, мышьяка, селена [5, 14].

В США рынок фиторемедиационных технологий быстро растет, примерно на 100-150 млн. долларов в год [5]. Основанная в 1983 году Lemna Technologies, Inc. разрабатывает и предлагает фиторемедиационные технологические циклы очистки сточных вод в широком диапазоне масштабов: частных хозяйств до небольших производств [17]. В 1990 году компанией была осуществлена система очистки с использованием ряски на Озере Дьявола в Северной Дакоте на площади 25 гектаров. Система была разработана для извлечения из воды нитратов и нитритов, сульфатов, аммония, уменьшения количества колибактерий. Для сбора отработанной ряски были спроектированы и построены специальные плавучие комбайны (рисунок 1.1) [18].



Рисунок 1.1 – Комбайн для сбора биомассы в очистных прудах, основанных на использовании ряски [18]

Отработанная ряска после очистки бытовых стоков, а также стоков животноводческих ферм, может быть использована в качестве корма сельскохозяйственных животных и, кроме этого, в качестве сырья для получения биоэтанола и биогаза. В основе этих технологических циклов лежит ферментативный гидролиз крахмала, содержащегося в ряске [19-20].

Крупной компанией по разработке фиторемедиационных технологий является и Phytotech Inc, основанная в 1993 году [14]. В девяностые годы прошлого века организация активно занималась очисткой почв, загрязненных свинцом в США и почв, подвергшихся радионуклидному заражению в Чернобыльской области на Украине. В 1995 году компания успешно тестировала ризофилтрационные технологии для очистки грунтовых и поверхностных вод в городе Аштабула, штат Огайо, а также небольшого пруда в окрестностях Чернобыльской атомной электростанции. Эти полевые исследования показали высокую эффективность ризофилтрации в очистке вод, загрязненных радионуклидами [14].

Накоплен успешный опыт применения биоремедиационных технологий даже в условиях северных широт: в Дании (130 сооружений), Швеции и Норвегии (71), Канаде (67) и Северной Америке (600). Здесь

успешно созданы и эксплуатируются биоплато, которых выполняю функцию сооружений доочистки сточных вод [3].

В странах третьего мира активно проводятся лабораторные и *in situ* эксперименты по подбору растений и оптимальных условий для очистки разнообразных стоков. В работах [10, 21-30] описаны количественные характеристики процессов извлечения различных тяжелых металлов, сульфатов, нитратов, низкомолекулярных органических веществ из бытовых и промышленных стоков, а также модельных растворов представителями различных видов рясковых рода *Lemna* L., эйхорнией и другими высшими водными растениями. Отмечается роль pH водных сред на динамику и степень накопления тяжелых металлов растениями. В частности, авторы [23] отмечают лучшую сорбцию ряской цинка при pH = 5-6.

Стоит, однако, отметить, что в некоторых случаях результаты, полученные разными авторами на одних и тех же видах по извлечению и накоплению одних и тех же металлов, могут весьма серьезно отличаться [10, 30-31]. Так, в работе [30] было показано, что *Spirodela polyrhiza* и *L. minor* накапливают никель вплоть до 3 г/кг сухого веса. Однако сами же исследователи приводят результаты и других экспериментов; в одном случае ряска накапливала никель в количестве 1,79 г/кг, в другом значение емкости по тому же металлу для *S. polyrhiza* было 0,13 г/кг, а для *L. gibba* – 0,19 г/кг. В описываемых экспериментах растения выращивались в разных питательных средах, что указывает на сильное влияние различных веществ на процессы поступления металлов в ткани и органы макрофитов. Аналогичные данные, в некотором смысле, были получены и на почвенных растениях в ходе фиторемедиационных исследований. Например, считается, что степень извлечения кадмия из почвы и его содержание в растениях растет по мере снижения pH почвенного раствора. Однако полевые эксперименты, проведенные на рисе, выращенном на красных кислых почвах, показали, что при pH почвы 4,95 содержание кадмия в зернах составляло 0,36 мг/кг, а при pH=6,54 – 0,43 мг/кг [31]. Результаты лабораторных экспериментов, в целом,

лишь с известными ограничениями могут быть экстраполированы на реальные технологические циклы.

Кроме этого, для видов ряски *Lemna* sp. известны и другие факторы, существенно влияющие на поглощение, накопление, иммобилизацию и даже деградацию загрязнителей [10]. Помимо химического состава среды (показано, например, что у *L. minor* снижается интенсивность поглощения Zn^{2+} в присутствии Fe^{3+} [29]) на эффективность очистки ряской оказывает существеннейшая особенность организма – это мелкое свободноплавающее растение. В связи с этим прямое влияние на загрязнители – поглощение, трансформация, иммобилизация эксудатами – может быть ограничено несколькими сантиметрами. Следовательно, воздействие на водоём глубиной несколько метров при отсутствии перемешивания слоёв будет небольшим. К тому же, у рясковых практически полностью отсутствует проводящая система, и потому ток поллютантов по апопласту вместе с водой за счет энергии Солнца будет вносить небольшой вклад в утилизацию загрязнителей. Основное накопление токсикантов идёт с использованием энергии самого растения [10].

Тем не менее, накопленный к настоящему времени массив экспериментальных и полевых работ [32-49] свидетельствует о том, что использование растений, в частности из семейства рясковых, для очистки стоков от широкого спектра тяжелых металлов, анионов кислотных остатков, гербицидов и пестицидов может быть весьма эффективным.

1.2. Растения семейства рясковых Lemnaceae

Рясковые – семейство однодольных растений. На основании морфологических, биохимических и генетических признаков выделяют 4 рода: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* & *Wolffiella* (некоторые ученые выделяют пятый – *Landoltia*) и 37 видов [50, 51]. Широко представлены в Северной и Южной Америке, Южной и Центральной Африке, в Европе, Южной Азии, на юге Австралии, по большей части в окультуренных районах. В тропиках и

субтропиках встречается примерно половина видов, остальные – в умеренном поясе [52].

Это самые маленькие представители цветковых растений, размеры которых редко превышает 1 см. Последовательно приспособляясь к обитанию в водной среде, растения в крайней степени редуцировали свои органы.

Рясковые – водные, свободноплавающие, большей частью многолетние, травянистые растения; только ряска тропическая, или равноденственная (*L. aequinoctialis*), из тропической Африки считается однолетней. Тело рясковых в литературе обозначается по-разному: фронд, листец, щиток, филлокладий, вайя, и даже лист или стебель. На его происхождение у ботаников были различные взгляды, считалось, что листец: а) имеет целиком стеблевую осевую природу; б) представляет собой лист; в) имеет осевую структуру в проксимальной части и листовую – в дистальной [53]. В настоящее время большинство ботаников придерживается последнего положения [52]. Листецы рясковых представляют собой симметричную или асимметричную, зеленую пластинку большей частью, уплощенную или плоскую, редко брюшная сторона имеет значительную выпуклость. Форма листецов может быть почковидной, округлой, эллиптической, ланцетовидной и линейными (у ряски – *Lemna* и спироделы, или многокоренника, – *Spirodela*) или шаровидной и овальной (у вольфии – *Wolffia*). Состоят они в основном из клеток хлоренхимы, разделенных большими межклеточными полостями (аэренхимой), которые заполняются воздухом или другим газом, для обеспечения плавучести растения (рисунок 1.2). Листецы существуют отдельно, или же объединяются в группы по два или более либо в цепочки короткими или удлиненными ножками (ряска тройчатая), которые представляют собой суженную часть листеца (гиалиновая нить).

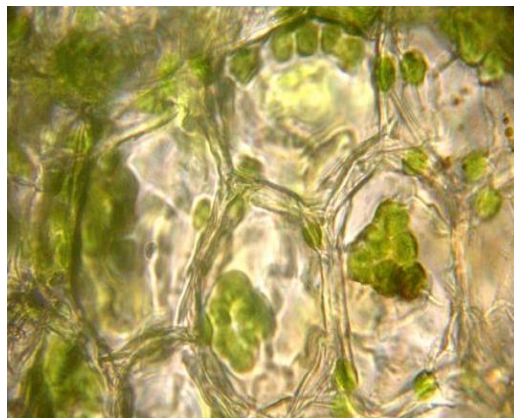


Рисунок 1.2 – Аэренхима (воздухоносная ткань) *L. minuta* (1000х). Большие межклеточные промежутки окружены паренхимными клетками, содержащими хлоропласты [54]

Часто присутствуют рафиды оксалата кальция (рисунок 1.3), а также пигментные клетки красного или коричневого цвета (иногда те и другие сразу). Эти клетки окрашивают весь листец (у цветущей ряски, вольфии) или только нижнюю часть его (спиродела) в коричневые или красно-фиолетовые цвета.

Пучок рафид – кристаллов
оксалата кальция

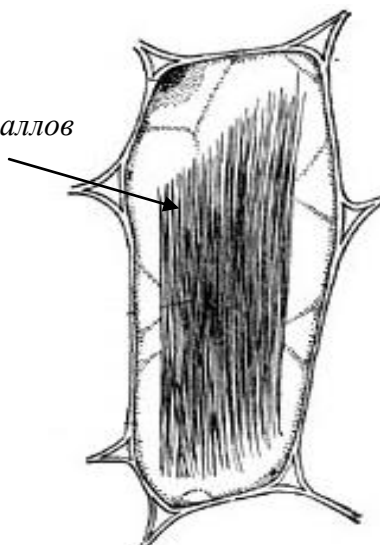


Рисунок 1.3 – Клетка ряски малой с рафидами [55]

Лишь у многокоренника в корнях имеются трахеиды; у прочих рясковых проводящая система практически отсутствует. Корни отсутствуют (у вольфии и вольфииеллы) или слабо развиты и не достигают грунта (у многокоренника и ряски). Они простые, неветвящиеся, лишены корневых волосков, менее 0,5 мм в диаметре, с корневым кармашком, в числе 1 или

нескольких отходят от вентральной поверхности листеца (рисунок 1.4) [56]. Подразделяется на вершину, заключенную в корневой кармашек, зону деления, зону роста и зону поглощения [57]. Основную роль в сорбции минеральных веществ играет нижняя поверхность листеца, тогда как корень выполняет функцию удержания и ориентации растения на поверхности воды [58].

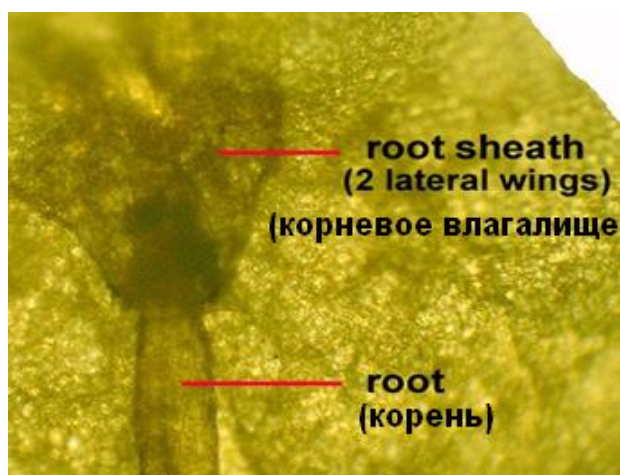


Рисунок 1.4 – Вентральная поверхность листеца ряски крошечной *L. perpusilla* [56]

У основания листеца, в проксимальной (её иногда называют базальной) части ряски и многокоренника имеются два боковых кармашка, которые также называются почечными, т. к. в них происходит заложение вегетативных почек. В процессе вегетативного размножения из них формируются дочерние листецы. Один из кармашков служит местом заложения соцветия, окруженного покрывалом. У вольфии и вольфиеллы в этой части листеца имеется только один базальный кармашек, служащий исключительно для вегетативного размножения. Соцветие у них лишено покрывала, или иногда оно заключено первоначально в рудиментарное пленчатое покрывало; расположено соцветие в специальной цветковой ямке (или в двух ямках) на дорсальной поверхности листеца.

Сильно упрощённое соцветие рясковых состоит из 1 – 2, редко 3 (у спироделы) мужских цветков и 1 женского. Околоцветник отсутствует. Мужские цветки имеют 1, редко 2 тычинки, несущие 2-гнездные пыльники, с поперечным раскрытием, или одногнёздные, вскрывающиеся по

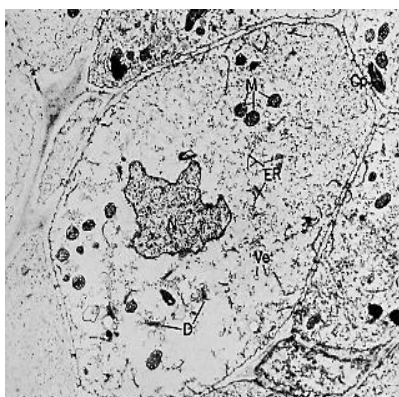
верхушечной пигментированной линии; прикрепляются они своим основанием к тонкой или веретеновидной тычиночной нити. У пыльцевых зерен оболочка шиповатая, однопоровая. Пестичные цветки помещаются между мужскими. Гинецей у них с 1-4, реже 7 базальными семяпочками. Столбик пестика короткий, рыльце в форме открытой чаши. Мешочкообразные, слабкрылатые и широкоовальные или шаровидные, иногда слегка продольно сплюснутые плоды рясковых нераскрывающиеся или раскрывающиеся продольно, содержат от 1 до 6 семян. Они крупные, зародыш прямой, эндосперма мало или он отсутствует. Семена овальной или почти шаровидной формы, бывают продольно- или сетчато-ребристыми, сетчатыми или гладкими, с губчатым наружным слоем и с уплощенной крышечкой на микропилярном конце [52].

Цветение у рясковых чрезвычайно своеобразно, происходит так редко, что специально регистрировалось. Например, в Финляндии, с 1895 по 1947 г. было зафиксировано 33 случая цветения. В Америке за последние 250 лет цветущую спироделу наблюдали не более 20 раз. Лишь 2 раза было отмечено цветение ряски в Польше с 1679 по 1959 г. Наблюдалось массовое цветение ряски в 1932 г. в Армении в озерах Лорийского плато. Для средней полосы России за период с 1814 по 1967 г. известно 25 находок цветущих рясок. Тем не менее, известны факты массового цветения ряски тройчатой, ряски горбатой, единичного цветения ряски малой в прудах города Новгорода в 1968 г. С 1972 по 1975 г. в бассейне реки Волги удалось наблюдать ежегодное цветение ряски. Вероятно, цветение рясковых не всегда замечается ботаниками из-за микроскопических размеров цветков [52]. В экспериментах, однако, было показано, что цветение у рясковых можно вызвать искусственно, подбирая освещенность и фотопериод, температуру и состав питательной среды [59-61]. Так, цветение в культуре ряски крошечной *L. perpusilla* Torr. Было получено 6 ч фотопериодом при освещенности 500 Лк и температуре 29 ± 2 °C [61].

Размножаются рясковые в первую очередь вегетативно, с помощью почек, находящихся в упомянутых выше кармашках. Из почек развиваются дочерние листецы, которые отделяются от материнского организма. Почки сформированы меристематическими клетками. По мере развития почки происходит быстрое формирование органов и структур листеца: корней, аэренхимы. Меристематические клетки превращаются в вегетативные. Как показали ультраструктурные исследования [62] имеются различия в строении клеток разных зон листецов, а также листецов разных возрастов (рисунок 1.5). Меристематические клетки молодых листецов, образующие проксимальную зону, обладают крупными ядрами округлой формы с хорошо оформленным ядрышком. Вегетативные ткани зрелых листецов образованы клетками с ядрами неправильной формы без ядрышек.



а



б

Рисунок 1.5 – Ультраструктура клеток ряски крошечной [62]: а) меристематическая клетка молодого листеца: N - ядро; Nu - ядрышко; Pd - плазмодесмы; M - митохондрия; Cr - хлоропласт; Va - вакуоль; D - диктиосома (аппарат Гольджи); ER - эндоплазматический ретикулум (x 19 000); б) вегетативная клетка зрелого листеца: N - ядро; Pd - плазмодесмы; M - митохондрия; Cr - хлоропласт; Va - вакуоль; D - диктиосома (аппарат Гольджи); ER - эндоплазматический ретикулум (x 5100)

С июня по август продолжается вегетативное размножение и происходит оно очень быстро: рясковые удваивают массу своего тела за 1-6 суток, удвоение же количества самих листецов происходит за 2-3 суток. Каждое растение в течение своей жизни продуцирует большое количество дочерних, которые некоторое время сохраняют связь с материнским, образуя группы или цепочки, а затем отделяются и становятся самостоятельными особями.

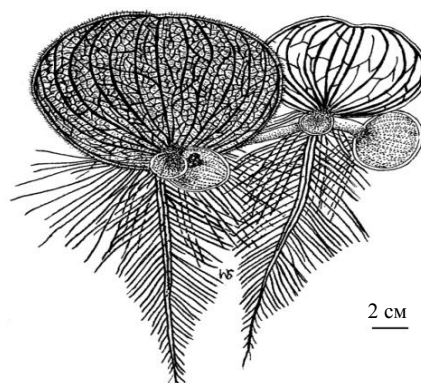
Для ряски малой *L. minor* описаны процессы старения и омоложения листецов и культуры в целом [63]. В процессе вегетативного размножения

происходит старение меристем материнских листецов, что приводит к продукции ими всё меньших по размеру листецов; чем старше материнский листец, тем меньшие по площади дочерние листецы он формирует. Площадь дочернего листеца может служить своего рода мерой физиологического возраста листеца материнского. Однако после нескольких поколений прогрессивного снижения площади дочерних листецов наступает период, когда дочерние листецы становятся несколько больше своих материнских, и длится он до момента достижения листецами исходного размера. В целом, клон ряски не стареет, но стареют и погибают отдельные листецы.

При наступлении зимних холодов или прочих неблагоприятных условий обычные листецы утолщаются, принимают более округлую форму, заполняются тяжелым крахмалом (ряска тройчатая) и погружаются на дно, либо переживают зиму в виде семян. Многие виды, например, многокоренник обыкновенный *S. polyrrhiza*, кроме того, производят особые покоящиеся почки, или турионы, которые есть не что иное, как видоизмененные листецы, меньше и толще обычных. Они представляют собой диски диаметром 2-3 мм, темно-зеленого или пурпурного цвета. Клетки их богаты крахмалом, вследствие чего турионы опускаются на дно и зимуют там без изменений. Формируются турионы как при низких (менее +10 °C), так и при высоких (+25 °C) температурах воды. Весной или при благоприятных температурных условиях и достаточном освещении турионы всплывают на поверхность и из них вырастают новые растения [62].

Произошли рясковые от предка современного водоплавающего тропического рода пистия (*Pistia*) из семейства ароидных [51, 64]. Ученые полагают, что таким предком можно считать *Limnobiophyllum scutatum* из палеоценовых отложений Канады, подробно описанным в [64]. Это было свободноплавающее травянистое растение, несущее розетку из 3-4 опушенных листьев, содержащих аэренхиму, многочисленные простые придаточные корни, а также 1-2 ветвящихся корня. Розетки объединялись в группы столонами. Морфологический анализ показал, что *L. scutatum* имел

признаки, характерные как для пистии, так и для разных групп рясковых. В частности, общий план расположения корней напоминает строение корней у



родов *Pistia* и *Spirodela*. Строение устьиц схоже со строением устьичного аппарата *Wolffia* (рисунок 1.6).

Рисунок 1.6 – Реконструкция *Limnobiophyllum scutatum* [64]

Таким образом, можно предположить, что эволюция в семействе рясковых шла по пути редукции органов и упрощении общей организации. Самыми примитивными являются представители рода *Spirodela* – они самые крупные в семействе, их листецы несут множество корней. Эволюционно молодые и прогрессивные – виды рода *Wolffia*. Эти рясковые имеют наименьшие размеры и лишь один почечный карман, у них отсутствуют корни.

Промежуточное положение занимает многочисленный род *Lemna*, представители которого несут один корень и два почечных кармашка (рисунок 1.7).

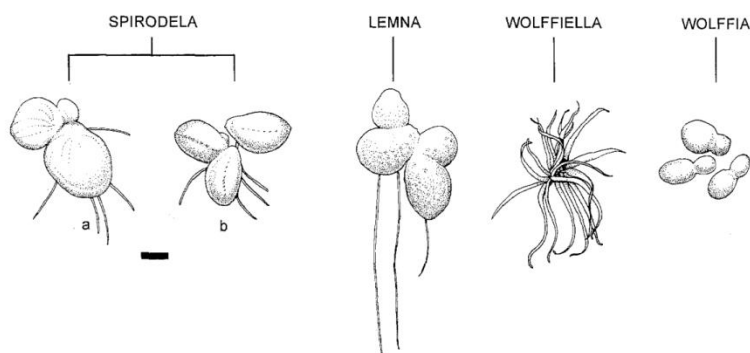


Рисунок 1.7 – Внешний вид представителей семейства *Lemnaceae*. а – *Spirodela polyrhiza*; б – *S. punctata*. Масштаб: 2 мм для *Spirodela*, *Lemna* и *Wolffiella*; 1 мм для *Wolffia* [50]

1.3. Биоэлектрогенез растений

Биоэлектрогенез, или биологический электрогенез, включает в себя комплекс механизмов, результатом работы которых является генерация биоэлектрических потенциалов (БЭП). В основу современной мембранной теории биоэлектрогенеза легли работы, главным образом, Ходжкина [65]. Её можно свести к некоторым главным положениям. 1. Генерация потенциалов происходит на цитоплазматической поверхностной мембране (внутриклеточные мембраны тоже могут формировать разности электрических потенциалов, однако именно электрогенезом на поверхностной мембране определяются электрические свойства клетки). 2. Разность потенциалов на поверхностной мембране имеет ионную природу. 3. Ионная асимметрия, то есть неодинаковое распределение по обе стороны поверхностной мембраны катионов и анионов, лежит в основе генерации разностей потенциалов.

Градиенты концентраций ионов создаются пассивными и активными механизмами [66-72]. Первые не требуют энергетических затрат со стороны клетки. В их основе лежат два фактора: 1) неодинаковая проницаемость биологической мембраны для ионов разных элементов; 2) разные концентрации ионов с наружной и внутренней стороны мембраны. В результате действия этих факторов одни ионы, перемещаясь по своему концентрационному градиенту внутрь клетки или наружу, лучше проходят мембрану, а другие хуже. Наибольшая проницаемость у мембраны в покое для ионов K^+ . Из-за того, что калия обычно больше внутри клетки, чем снаружи, то его ионы выходят из клетки, что приводит к формированию положительного заряда на внешней поверхности мембраны. Обращенная к цитоплазме сторона мембраны заряжается отрицательно. Возникающий мембранный потенциал (МП) по своему значению будет, однако, меньше равновесного калиевого потенциала, того, который бы создавался лишь выходом K^+ , так как и другие ионы также могут проникать через мембрану, хотя и в меньшей степени. В аксоне кальмара, например, мембранный

потенциал, рассчитанный исходя из разности концентраций K^+ по обе стороны мембраны, составляет около -90 мВ (внутреннее содержимое заряжено отрицательно), а измеренный потенциал оказался близким к -60 мВ. Объясняется это тем, что мембрана аксона проницаема определенной степени для других катионов и анионов, а не только лишь для ионов калия.

В случае с растительной клеткой определенный вклад в пассивную компоненту суммарного потенциала вносит целлюлозная клеточная стенка с аморфным матриксом из полимерных молекул пектина, несущая отрицательный поверхностный заряд около 0,01 экв/мг [70]. Благодаря этому заряду клеточная стенка обладает отчетливо выраженными катионообменными свойствами с преимущественной избирательностью к связыванию Ca^{2+} , который играет важную роль в регуляции проницаемости клеточной стенки по отношению к K^+ и Na^+ [70]. Измерения потенциала клеточной стенки харовых водорослей, выполненные с помощью микроэлектродов, показали, что он имеет величину $-40 \div -70$ мВ. У высших растений его величина, возможно, несколько ниже: $-20 \div -30$ мВ [70]. Такие результаты свидетельствуют о том, что клеточная стенка способна в значительной мере влиять на общий потенциал растительной клетки. Но, судя по всему, величина этого вклада определяется от плотности контакта клеточной стенки с расположенной ниже плазматической мембраной. Чем этот контакт плотнее, тем больше будет вклад клеточной стенки в измеряемый клеточный потенциал и наоборот.

Сама мембрана, плазмалемма, состоящая из двойного слоя фосфолипидов и ассоциированных с ним белков, вносит некоторый вклад в формирование суммарного потенциала клетки. Молекулы липидов мембран состоят из полярных гидрофильных головок и жирных кислот, формирующих гидрофобные хвосты. Полярные головки несут на себе отрицательные заряды или могут быть нейтральными (в случае, если они имеют одновременно положительные и отрицательные заряды) [73]. Локализация полярных головок на поверхности мембраны приводит к

образованию в непосредственной близости от мембраны некоторого отрицательного потенциала (ψ_0), который, как показывают исследования, чрезвычайно важен в процессах транспорта катионов и анионов в растительные клетки [74-76].

Активные механизмы генерации потенциала вносят существенный вклад в суммарный потенциал растительной клетки. В их основе лежит работа особых ферментов – транспортных аденозинтрифосфатаз (АТФаз). Осуществляя гидролиз АТФ, эти белки параллельно расходуют выделяющуюся энергию для транспорта ионов через мембрану. В результате чего и создается активная компонента мембранного потенциала. Активный механизм в клетках высших растений генерирует до 70 % от всей величины потенциала. У животных вклад активной компоненты достигает 1-2 % [67].

У животных активную долю потенциала создаёт, преимущественно, Na^+/K^+ -АТФаза, у грибов и растений – H^+ -АТФаза. Первая транспортирует из клетки 3 иона Na^+ и одновременно поставляет в клетку 2 иона K^+ , H^+ -АТФаза выкачивает из цитоплазмы H^+ . Работа этих ферментов приводит к зарядке мембраны, т. е. генерации активной компоненты мембранного потенциала, при этом внутренняя поверхность заряжается отрицательно, а внешняя – положительно.

Транспортные АТФазы в настоящее время хорошо изучены. Установлено, что они представляют собой интегральные белки, т. е. их полипептидная цепь несколько раз пересекает мембрану. Структурно АТФазы состоят из двух частей – каталитической, которая взаимодействует с АТФ и обращена внутрь клетки, и канальной, направленной наружу. На рисунке 1.8 приведена схема транспортной H^+ -АТФазы. Гидролиз молекул АТФ приводит к повороту подвижной части молекулы (ротора) вокруг своей оси и перемещению протонов против их электрохимического градиента [16, 77].

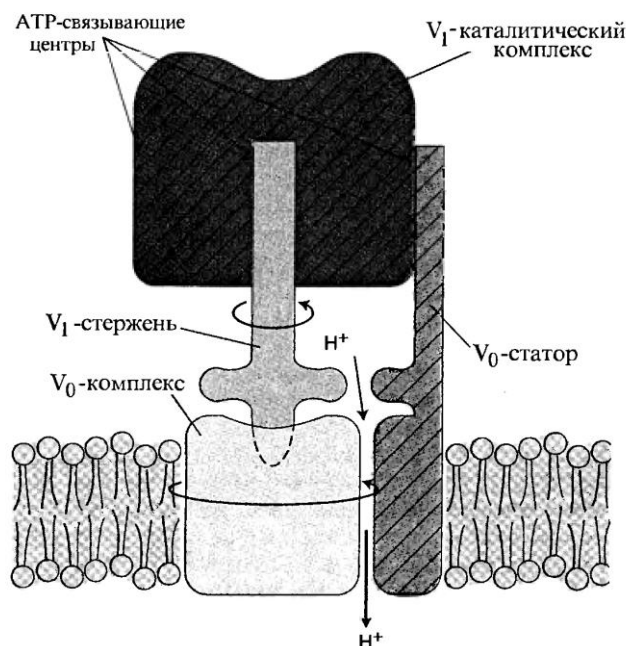


Рисунок 1.8 – Ротор-статорная модель V-АТФазы [16]

В результате активного и пассивного механизмов генерируется трансмембранная разность потенциалов на поверхности клетки – потенциал покоя (ПП).

Значительная составляющая метаболической компоненты в общую величину ПП у высших растений, по-видимому, имеет большое значение для функционирования этих организмов. ПП высших растений достигает больших значений (160–180 мВ) благодаря метаболической компоненте, благодаря чему обеспечивается высокая степень энергизации плазматических мембран клеток. Для противостояния сильным стрессовым воздействиям это представляется важным свойством [67]. Очень важно, что метаболическая компонента, создаваемая при участии H^+ -АТФазы, может подвергаться конверсии, то есть может осуществляться переход $\Delta\Psi$ в ΔpH . В результате этого возникает разность электрохимических потенциалов протона на мембране ($\Delta\mu H^+$), на основе которой проходят процессы вторичного активного транспорта, осуществляется молекулярная подвижность и другие процессы [67].

Функции ПП в растениях разнообразны и чрезвычайно важны. К таковым можно отнести следующие функции: 1) энергетическая (использование энергии мембранного потенциала на совершение

мембранных процессов – например, транспорт ионов через каналы); 2) защитная (выражающаяся в компенсаторном эффекте мембранного потенциала при подавлении мембранных процессов сильными внешними воздействиями например, охлаждением); 3) регуляторная (осуществляемая в основном через изменение структурного состояния белковых и липидных компонентов мембраны); 4) морфогенетическая (возможная организующая роль электрических полей в процессах роста и развития растений) [66-72].

1.3.1. Импульсная электрическая активность у высших растений

Живые ткани обладают свойством импульсной электрической активности. Различные условия способны вызвать не только изменение уровня потенциала покоя мембраны, но и временные релаксационные процессы. Возникающая при этом форма колебаний мембранного потенциала, как правило, значительно отличается от гармонических колебаний. Отсюда термин «импульсная электрическая активность» [70].

Импульсная электрическая активность связана в определенной степени с физиологическими процессами растений, однако она не является их пассивным отражением, а играет самостоятельную роль, передавая сигналы об изменениях в окружающей среде, вызывая ответ на эти изменения. Известно, что в жизнедеятельности высших растений важную роль играют самопроизвольные отклонения биопотенциалов от некоторого среднего уровня. Микрофлуктуации такого типа являются триггерами самоорганизации, которые определяют поведение организма в целом при выборе возможных стационарных состояний. В последнее время активно исследуется импульсная электрическая активность такого рода для выявления её физиологического значения.

В настоящий момент на разработана ещё полная и четкая классификация импульсной электрической активности растительных клеток. Выделяют, тем не менее, три её типа [70, 72, 78].

1. Потенциалы действия (ПД) – импульсные электрические реакции на раздражение, превышающее некоторый пороговый уровень. К

физиологическим ответам такого типа относят и ритмические потенциалы действия. У высших растений ПД могут распространяться по тканям и органам, то есть передаваться от клетки к клетке, а могут носить местный характер, т. е. передаваться в пределах только раздражаемых клеток. К потенциалу действия близок локальный потенциал. Его отличие от ПД заключается в том, что он является местной, быстро затухающей при распространении импульсной электрической реакцией, сила которой зависит от интенсивности внешнего воздействия [70, 72, 78-80].

2. В ответ на повреждения высшие растения генерируют переменные потенциалы (ВП) – особые электрические реакции, для распространения которых, по крайней мере, частично, необходима диффузия некоей возбуждающей «раневой» субстанции (фактор Рикка) по ксилеме, либо колебаниями гидростатического давления. ВП представляет собой комбинацию электрического и химического возбуждения, он, в отличие от ПД, не способен к самоподдержанию, а потому не распространяется на значительные расстояния по растению, имеет длительную не регулярную нисходящую ветвь импульса, то есть фазу реполяризации. Эти сигналы могут быть вызваны поранением, удалением органа, ожогом. Предположительно, для обычных, не обладающих моторной активностью растений, ВП – представляют собой базовый тип дальней координирующей связи между различными частями [70, 72, 81].

3. Микроритмами называют ритмическую электрическую активность в диапазоне амплитуд от нескольких десятков до сотни микровольт. Такая активность, в некоторых случаях, может быть вызвана временным охлаждением, коррелирует со стимуляцией образования этилена. Кроме того, эти флуктуации возникают также при резком увеличении концентрации ауксина. Возникновение, вернее, учащение микроритмики при охлаждении связано предположительно с увеличением кальциевой проницаемости плазмалеммы и возникновением потока Ca^{2+} из апопласта внутрь клеток. Возможно, микроритмы (так же, как ПД и ВП) вызывают быстрое повышение

концентрации цитозольного Ca^{2+} , который, являясь, в свою очередь, межклеточным сигналом, запускает стрессовую реакцию, в частности стимулирует выработку этилена [70, 81].

Наиболее изученной формой импульсной активности у растений является потенциал действия. Физический смысл ПД заключается в следующем. Внешнее воздействие на клетку растения может приводить к смещению мембранного потенциала E_m , в область отрицательных значений, либо к некоторому смещению в положительную область. При этом E_m сначала монотонно переходит на новый уровень, а после прекращения воздействия также монотонно возвращается к исходному значению. Это электротонические, или пассивные, изменения E_m . Если сдвиг мембранного потенциала в положительную сторону превышает некий пороговый потенциал $E_{\text{пор}}$, то происходит активация возбудимых селективных ионных каналов, через которые диффундируют по электрохимическому градиенту заряженные частицы – катионы или анионы. Ток в клетку этих частиц приводит к резкой спонтанной деполяризации, что может изменить знак мембранного потенциала. Мембранный потенциал достигает определенной величины E_m , после чего выходящий из клетки ионный поток возвращает значения мембранного потенциала к исходному уровню [70, 72, 78].

В целом на современном этапе развития электрофизиологии растений развитие потенциала действия представляют следующим образом. Деполяризация мембраны до порогового уровня возбуждения вызывает открытие потенциал зависимых кальциевых каналов. Кальций, поступая внутрь клетки, активирует ионселективные хлорные каналы одновременно угнетая работу H^+ -АТФазы. Снижение концентрации хлора в цитоплазме и снижение активности H^+ -АТФазы создают фазу деполяризации до максимального значения ПД. Однако уже в этой фазе процесса происходит активация калиевых каналов, и калиевый поток формирует первый этап фазы реполяризации до уровня K^+ -равновесного потенциала. После этого активируются H^+ -АТФазы, вероятно, за счет удаления из клетки избытка

Ca^{2+} . Работа протонной помпы формирует финальный, более значительный по величине этап реполяризации, завершая развитие импульса [70, 72, 78, 80, 82] (рисунок 1.9).

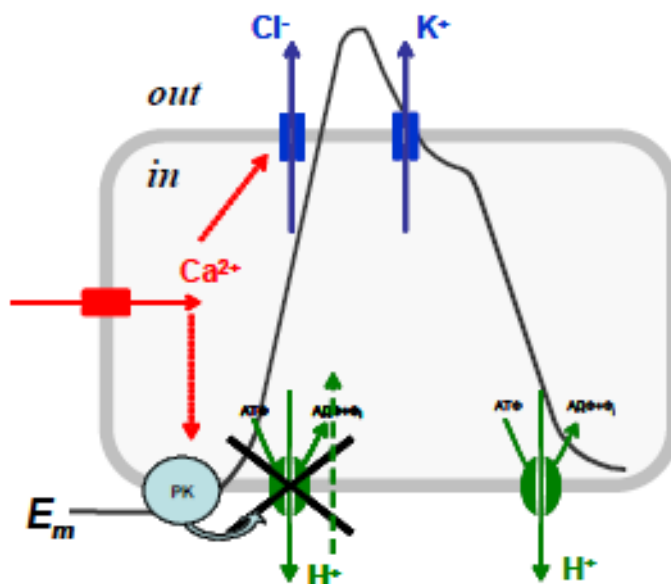


Рисунок 1.9 – Предполагаемая схема механизма генерации потенциала действия в клетках высших растений [82]

Описанные изменения с некоторым запаздыванием повторяются на соседнем участке мембраны, т. к. электротонический потенциал распространяется вдоль клетки как вдоль кабеля, обладающего утечкой. Всё это приводит к смещению МП выше порогового уровня, что вызывает активацию возбудимых ионных каналов на некотором удалении от места воздействия. Распространение импульса в наиболее общей форме описывается с помощью так называемого кабельного уравнения, определяющего распределение электротонического потенциала по длине клетки,

$$\frac{\partial^2 V(x,t)}{\partial x^2} = \frac{V(x,t)}{\lambda^2} + \frac{\tau_m}{\lambda^2} \times \frac{\partial V(x,t)}{\partial t}, \quad (1.1)$$

где $V(x,t)$ – мембранный потенциал, отсчитанный от потенциала покоя (ось x направлена вдоль клетки), t – время, λ – кабельная постоянная или характеристическая длина, τ_m – постоянная времени мембраны.

При этом

$$\lambda^2 = R_m / (R_0 + R_i), \quad (1.2)$$

где R_m —сопротивление мембраны, R_0+R_i — сумма сопротивлений внешнего раствора и внутренней среды клетки, приходящихся на единицу длины клетки, $\tau_m=C_mR_m$, где C_m — емкость мембраны.

В соответствии с кабельной моделью электрический импульс распространяется как по нервному волокну, так и по плазматическим мембранам растительных клеток, объединенных в единый компартмент плазмодесмами [70].

Интересно отметить, что у растений, так же, как и у животных, наблюдается период рефрактерности, то есть интервал времени, в течение которого ткани неспособны генерировать ПД [70, 78]. Однако у растений это время значительно превышает рефрактерность у животных. Например, период абсолютной рефрактерности нервов млекопитающих составляет 5 мс, в то время как у представителей семейства *Characeae* достигает 4-40 с [78-79].

Представления об универсальности ПД в качестве сигнала у всех организмов, в том числе и у высших растений, сформировались уже достаточно давно. Подобные идеи высказывались Дарвином, получили развитие в работах Боса, формулировались и подтверждались в экспериментах Хоувинка, Лоу-Чень-Хо, Умрата [68]. По мнению Х. С. Коштойнца ПД являются универсальными переносчиками сигналов в силу сравнительно-эволюционных причин [68]. Сейчас многие ученые полагают, что при определенных условиях все растения способны к генерации ПД. Согласно другим, более осторожным оценкам, у некоторых видов такая форма электрической активности может отсутствовать. В ряде обзоров приводятся данные, подтверждающие идею о широком распространении ПД у высших растений [78] (таблица 1). Установлено, что потенциалы действия встречаются у тыквы, фасоли, подорожника, липы, кукурузы, гороха, подсолнечника, свеклы и других растений, принадлежащих к семействам бобовых, вьюнковых, молочайных, пасленовых, гречишных и других [70-71, 78].

Таблица 1 – Документированные физиологические эффекты электрических сигналов в растениях [78]

Стимул	Сигнал	Растение	Физиологический эффект
Механический	Потенциал действия	<i>Dionaea</i>	Смыкание ловушки, секреция пищеварительных ферментов
Механический	Потенциал действия	<i>Drosera</i>	Движение ресничек для захвата насекомого
Холодовой шок, механический	Потенциал действия	<i>Mimosa</i>	Регуляция движения листьев
Электрический	Потенциал действия	<i>Chara</i>	Остановка движения цитоплазмы
Электрический	Потенциал действия	<i>Conocephalum</i>	Усиление дыхания
Опыление	Потенциал действия	<i>Incarvillea, Hibiscus</i>	Усиление дыхания
Полив	Потенциал действия	<i>Zea</i>	Усиление газообмена
Холодовой шок	Потенциал действия	<i>Zea</i>	Снижение флоэмного транспорта
Электрический, охлаждение	Потенциал действия	<i>Luffa</i>	Снижение интенсивности роста стебля
Электрический	Потенциал действия	<i>Lycopersicon</i>	Индукция экспрессии гена <i>pin2</i>
Нагрев	Вариабельный потенциал	<i>Vicia</i>	Усиление дыхания
Нагрев	Вариабельный потенциал	<i>Solanum</i>	Индукция синтеза жасмоновой кислоты и экспрессии гена <i>pin2</i>
Поранение	Вариабельный потенциал	<i>Pisum</i>	Подавление синтеза белка, формирование полисом
Нагрев	Вариабельный потенциал	<i>Mimosa, Populus</i>	Временное снижение фотосинтеза

ПД растений, тем не менее, имеют весьма характерные особенности. Они требуют для своего развития большего времени, чем у животных, а и у многих растений при этом не наблюдаются видимые физиологические эффекты. Потенциалы действия могут распространяться на значительные расстояния от места возникновения по тканям, но в некоторых случаях их распространение ограничено пределами раздражаемых клеток. Поэтому идентифицировать такие потенциалы действия как истинные ПД не всегда корректно. В целом можно считать быстрые регенеративные колебания мембранного потенциала потенциалом действия, если они отвечают следующим критериям [66, 68-70, 78]:

1. способность к электрическому распространению;
2. возможность электрической стимуляции;
3. подчинение правилу «все или ничего»;
4. рефрактерность;
5. процесс может быть вызван суммацией отдельных подпороговых стимулов;
6. возможность осцилляции.

В целом роль ПД у высших растений может быть определена как сигнальная. В некоторых процессах она очевидна. К таким относят движение органов у локомоторных растений, оплодотворение и ряд других. Развито и обосновано представление о том, что ПД вызывает в тканях, по которым он распространяется и которых он достигает, временное повышение устойчивости к неблагоприятным воздействиям, которое некоторые авторы обозначают как предадаптация [81-86].

1.3.2. Биоэлектrogenез растений рода *Lemna* L.

Рясковые отличаются небольшими размерами, высокой скоростью воспроизведения, относительной простотой анатомического строения, размножаются они преимущественно вегетативно. Помимо этого, температурные условия, освещенность и питание рясковым создать проще, чем другим растениям. Эти особенности сделали представителей семейства Lemnaceae популярными объектом морфогенетических, физиологических и биохимических исследований [52, 87].

Благодаря отмеченным выше свойствам, разные виды рясок активно использовались, в том числе, и для изучения особенностей генерации биоэлектрических потенциалов [88-98]. Работы проводились в 70-80 гг. 20 века, применялась микроэлектродная техника для отведения внутриклеточного потенциала между вакуолью и внешней средой. Изучались влияния условий выращивания ряски (на свету/в темноте, в присутствии/отсутствии в среде культивирования сахарозы), содержания в растениях АТФ на величину клеточного потенциала. Было показано, что

потенциал растений *L. gibba* G1, выращенных в отсутствии сахарозы был значительно ниже, чем у тех, которые росли на среде с сахарозой: -90 мВ против -280 мВ. Кроме этого, у рясок с низким потенциалом отмечалось пониженное содержание АТФ и низкая скорость эндогенного дыхания. Это свидетельствует о том, что, как и других растений, у *Lemna* основной вклад в клеточный потенциал вносит активная составляющая, которая обеспечивается работой H^+ -АТФазы: фермент, используя химическую энергию АТФ, выкачивает из цитоплазмы во внешнюю среду H^+ , гиперполяризуя клеточный потенциал выше диффузионного потенциала.

В этой связи особое внимание заслуживает работа [90], в которой автор отмечает, что, по всей видимости, у вида *L. paucicostata* штамм 6746 имеется ещё некоторый энергозависимый процесс, приводящий к гиперполяризации мембраны, но не связанный с работой H^+ -АТФазы плазмалеммы. Показано, что добавление в среду в процессе измерения клеточного потенциала арсената и дициклогексилкарбодиимида (соединения, нарушающие процесс окислительного фосфорилирования) вызывало существенное снижение содержания АТФ в растении, но практически не сказывалось на величине потенциала. Более того, в присутствии арсената, потенциал даже несколько повышался. Так же отмечалось, что при добавлении в анаэробных условиях на свету гербицида 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилурина (подавляющего фотосинтез), или KCN в темноте приводило к сильной деполяризации при небольшом снижении количества АТФ в клетках. По мнению автора, такие результаты могут свидетельствовать о большой роли дыхательных процессов в генерации потенциала.

В ряде работ [92-98] проведены исследования по влиянию процессов поглощения различных соединений, преимущественно аминокислот и сахаров, а также анионов – сульфата, фосфата и нитрата на величины и динамику потенциала. Было показано, что усвоение листецами глицина, аланина и гексоз (глюкозы, фруктозы, сахарозы и др.) вызывает временную деполяризацию мембраны, при этом, как правило, снижение потенциала

было тем больше, чем выше концентрации добавляемого вещества (рисунок 1.10).

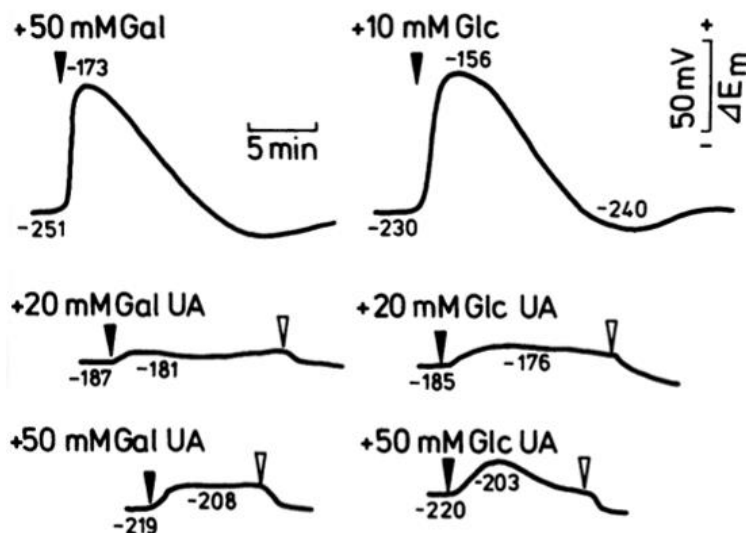


Рисунок 1.10 – Мембранная деполяризация клеток листецов ряски *L. gibba*, вызванная добавлением в среду галактозы и глюкозы (верхний ряд кривых) и их уоновых кислот (нижние ряды кривых). Черные стрелки – добавление, белые – удаление сахаров [92]

Кроме этого, на деполяризацию при добавлении глюкозы оказывала влияние величина рН внешней среды: при высоких концентрациях H^+ (рН = 4) добавление 50 мМ глюкозы вызывало относительно небольшое изменение потенциала ($\Delta E = 58$ мВ). Повышение рН до 5,7 приводило к бóльшей смене – $\Delta E = 75$ мВ [92]. Результаты свидетельствуют о том, что транспорт указанных веществ протекает за счет энергии градиента протонов на внешней и внутренней сторонах мембраны клетки. По всей вероятности, в процессе участвуют транспортные белки, работающие по принципу симпорта с протоном: белок связывается на внешней стороне мембраны с молекулой сахара, или аминокислоты и протоном, затем претерпевает конформационные изменения и перемещает захваченные частицы на противоположную сторону, после чего происходит диссоциация комплекса [16, 77]. Транспорт протонов в клетку приводит к временному снижению потенциала – деполяризации мембраны, который восстанавливается благодаря работе H^+ -АТФазы.

Аналогичные изменения потенциала наблюдались в процессе транспорта анионов [95, 98]: происходили временные деполяризации, а сам процесс зависел от содержания АТФ в клетках (рисунок 1.11).

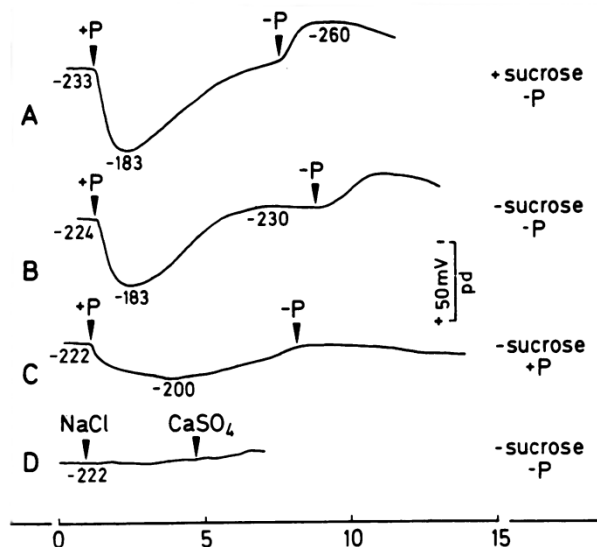


Рисунок 1.11 – Деполяризация плазмалеммы листцов *L. gibba* 1 мМ NaH_2PO_4 при pH 5,6 в 0,5 мМ CaSO_4 , в темноте. Растения, голодающие по фосфату (-P), находились на 0,5 мМ CaSO_4 в течение 24 ч до измерений (A, B, и D). A, растения выращивали в присутствии 29 мМ сахарозы; B, растения выращивались без сахарозы в течение 12 дней; C, растения, выращенные в присутствии 1,47 мМ фосфата, выдерживались в 0,5 мМ CaSO_4 в течение 8 ч до экспериментов; D, влияние 1 М NaCl на потенциал в присутствии 0,5 мМ CaSO_4 . Черные стрелки – добавление в среду вещества [98].

Транспорт анионов и некоторых других молекул за счет энергии протонного градиента через симпортеры известен для клеток корней почвенных растений [16]. В случае с ряской интересно, что измерения производили на клетках самого листца. Это говорит о функциональной аналогии поверхности тела рясковых с корнем прочих высших растений.

1.4. Гистохимические исследования

Гистохимические исследования направлены на изучение химического состава тканей и клеток при сохранении их структуры, а также установление локализации химических веществ в определенных компонентах тканей, типах клеток и клеточных структурах [99-103]. В силу того, что гистохимия имеет своей основной целью установление связи между выявляемыми веществами и их структурной локализацией, её можно в значительной мере рассматривать как топохимию, или гистотопологию [99]. Схожий по смыслу

термин цитохимия применяется в литературе в двух значениях – либо как ультрагистохимия клетки, либо как сумма микроскопических методов, позволяющих проводить химический и ферментативный анализ клеток или групп клеток при сохранении их морфологии. Сохранение целостности биологических структур при анализе – главное отличие гистохимического подхода от биохимического.

Оформление гистохимии как научного направления произошло в середине XIX века благодаря трудам французского фармацевта, ботаника и микроскописта Франсуа Винсента Распайля (F. V. Raspail) (1794-1878), который считается её основателем [99-100]. Ещё в 20-30-х годах XIX-го века он опубликовал свои первые работы по ботанической гистохимии. Для изучения процесса оплодотворения у злаковых Ф. В. Распайль использовал йодную реакцию на крахмал. В 1829 году им впервые была применена ксантопротеиновая реакция на белки, также ему приписывается открытие микросжигания для изучения неорганических соединений в тканях. Он же был первым ученым, который занимался определением pH протоплазмы с использованием индикаторных красителей (лакмус)[100].

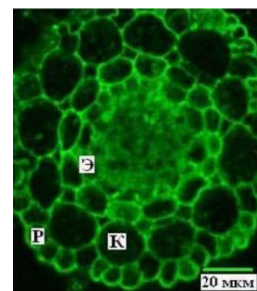
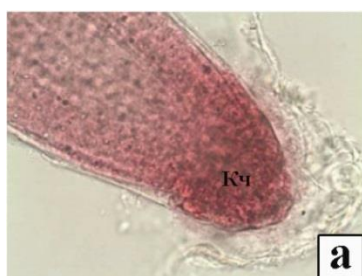
Во второй половине XIX века гистохимия являлась разделом биохимии животных, в конце века это направление стало рассматриваться как раздел физиологии животных и только в 30-х годах прошлого столетия гистохимия вновь стала считаться составной частью наук о тканях и клетках. Становление современной гистохимии и оформление ее как самостоятельного научного направления связано с появлением в 50-х годах XX столетия ряда крупных специализированных научных журналов: *Experimental Cell Research* (1950); *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (1953), *Acta Histochemia* (1954); *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* (1955); *Rivista di Histochemica* (1955); *Annales de Histochemie* (1956); *Histochemie* (1958). До выхода этих изданий, специальные работы по гистохимии публиковались в основном в журнале *Stain Technology* (1925, с 1991 г. журнал называется *Biotechnic and*

Histochemistry) и в многочисленных журналах по микроскопии и микроскопической анатомии [99-101].

В конце 50-х годов были опубликованы две классические книги крупнейшего бельгийского цитолога Жана Браше «Биохимическая цитология» (1957) и «Биохимическая эмбриология» (1960), в которых автором описаны подробные исследования цитофизиологии клеток (цитоплазмы и ядра покоящейся клетки, а также их взаимодействие у одноклеточных организмов, при эмбриональной дифференцировке и при малигнизации клеток). На примере изучения, в основном, нуклеиновых кислот в клетках при помощи цитохимических методов, автор показал широкие возможности цитохимии для клеточной биологии и обозначил цитохимию как биохимическую цитологию [99-100].

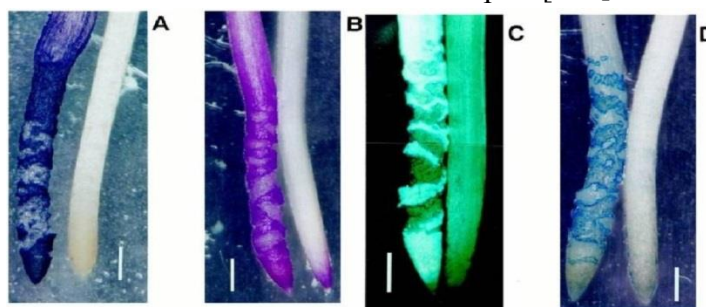
В настоящее время гистохимический анализ широко применяется во всех направлениях биологии. Гистохимия развивается на стыке различных наук и, прежде всего, на стыке гисто- и цитологии, биохимии, аналитической химии и клеточной биофизики. Развитие и совершенствование гистохимии связано с развитием химии красителей, разработкой оптических и оптико-электронных приборов, методов компьютерной обработки изображений, развитием теоретической и прикладной оптики (микрофотометрия) и ряда биологических наук – иммунологии, клеточной инженерии, молекулярной биологии. Последние достижения гистохимии связаны с применением некоторых методов молекулярной биологии нуклеиновых кислот, что привело к разработке специальной гистохимической технологии, которая вошла в научную литературу под названием гибридизация мРНК *in situ* и расцвету иммуноцитохимии и иммуногистохимии [99, 102].

Гистохимические техники являются эффективными инструментами для анализа локализации и распространения в клетках и тканях различных веществ: белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, фенолов, суберина, алкалоидов, таннинов, гормонов, перекиси водорода, а также широкого спектра ионов [99-121] (рисунок 1.12)



Апекс корня *Alyssum*, выращенного в присутствии 30 мкМ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, окрашивание диметилглиоксимом. Кч – корневой чехлик [103].

Распределение Zn в корне *Thlaspi caerulescens* (экотип *Lellingen*) после 7 недель инкубации на растворах $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 200 мкМ. Р – ризодерма, К – кора, Э – эндодерма [104]



Гистохимический обнаружения перекисного окисления липидов и других событий, вызванных алюминием в корнях гороха. Саженьцы обрабатывали (слева) 10 мкМ алюминия в 100 мкМ CaCl_2 (pH 4,75) в течение 24 ч, справа – без воздействия алюминия. Корни окрашивали гематоксилином (А, накопления алюминия), реагентом Шиффа (В, перекисное окисление липидов), анилином голубым (С, производство каллозы), или эванс синий (D, потеря целостности мембраны плазмы). С – изображение, полученное в флуоресцентной микроскопии, А, В и D – в обычной оптической. Бар на каждом графике равен 1 мм [102]

Рисунок 1.12 – Примеры гистохимических исследований растений

В основе гистохимических исследований лежат реакции между исследуемым веществом и специально подобранным реагентом. Результатом такого взаимодействия является образование окрашенного либо флуоресцирующего комплекса. По распределению окраски (флуоресценции) в препарате можно судить о локализации, а по интенсивности – о количественном присутствии в тканях и клетках интересующего вещества [99-102]. Исследования проводят либо с использованием обычной, либо применяя флуоресцентную микроскопию. До проведения самой реакции главной задачей исследования является правильная подготовка ткани. Здесь очень важно сохранить исследуемые вещества в тканях и клетках, при котором можно судить об их прижизненном состоянии. При этом

необходимо перевести исследуемую ткань из лабильного состояния живого вещества в стабильное. Для этой цели используют два метода:

- 1) консервирование нативного материала глубоким замораживанием;
- 2) химическая фиксация.

Для сохранения прижизненной структуры в тканях пригодны оба этих подхода. Тонкие срезы получают с помощью микротомы. При этом используют обычные гистологические техники [100].

Однако для изучения присутствия металлов и стронция в растениях используют временные препараты: срезы делают бритвой от руки, сами срезы не подвергаются консервации и фиксации [107-111]. Анализ проводят сразу после приготовления среза, осуществляя гистохимическую реакцию прямо на предметном стекле.

В основу принципа классификации красителей, используемых в гистохимии, положена их химическая структура, в частности, наличие определенных групп – хромофоров. Согласно этой классификации все красители можно подразделить на следующие основные классы [100].

1. Нитрокрасители содержат поляризующий электроноакцепторный заместитель – нитрогруппу ($-\text{NO}_2$).
2. Нитрозокрасители: к цепочке сопряженных двойных связей присоединена нитрозогруппа ($-\text{NO}$), играющая роль электроноакцепторного заместителя.
3. Азокрасители содержат одну или несколько азогрупп ($-\text{N}=\text{N}-$) в цепочке двойных сопряженных связей. Бывают моно-, ди- и полиазокрасители в зависимости от числа азогрупп.
4. Арилметановые красители: в хромоформной системе арилметановых красителей имеется центральный атом углерода и цепочки двойных сопряженных связей в виде нескольких ароматических колец, на которых находятся электронно-донорные (ДЭ) и электронно-акцепторные (АЭ) заместители: $\text{ДЭ}-\text{Ar}-\text{CR}=\text{Ar}'=\text{АЭ}$.

5. Ариламиновые красители имеют общую формулу: ДЭ-Ar-N=Ar'-АЭ.

6. Сернистые красители – разнообразные органические соединения, в состав молекул которых входит сера, включенная в гетероциклы.

7. Индигоидные красители: включают индиго, тиюиндиго и их производные.

8. Антрахиноновые красители: красители, производные антрахинона (рисунок 1.13)

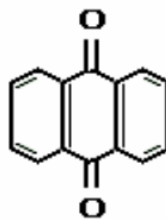


Рисунок 1.13 – Структурная формула молекулы антрахинона [100]

9. Кубовые полициклические красители: в состав их молекул входит несколько ароматических циклов и не менее двух карбонильных групп, углеродные атомы которых принадлежат ароматическим структурам.

10. Фталоцианиновые красители: содержат четыре остатка пиррола, которые связаны атомами азота.

11. Молекулы полиметиновых красителей имеют цепочку двойных сопряженных связей, включающих свободные или замещенные метиновые группы -CR=, связывающие ДЭ- и АЭ-заместители: ДЭ-(CR=CR')_n-CH-АЭ.

12. АзOMETиновые красители содержат цепочку двойных сопряженных связей включающие азOMETиновые группы →C=N-

Внутриклеточные и межклеточные вещества кислой природы, легко окрашивающиеся основными анилиновыми красителями, называются базофильными. К таким соединениям относятся нуклеиновые кислоты, сульфатированные полисахариды, олигосахариды, в состав которых входят сиаловые и уроновые кислоты.

Тканевые и клеточные структуры, содержащие вещества, которые хорошо прокрашиваются кислыми красителями, называются

ацидофильными, или иногда используют термин – ацидофилия тканевых и клеточных структур.

Кислые красители представляют слабые органические соединения и хромоформной частью таких красителей являются катионы, в то время как хромоформные части основных красителей представляют анионы.

При взаимодействии ряда красителей с тканевыми веществами происходит изменение максимума в спектре поглощения красителя. Это свойство красителей называется метахромазией. Молекулярный механизм метахромазии, по-видимому, связан с конформационными изменениями молекул красителя при их взаимодействии с внутриклеточными структурами. В гистохимической практике используются некоторые красители тиозинового ряда, которые меняют свой цвет от синего до красного цвета.

Особенно выраженную метахромазию вызывают сульфатные группы, в меньшей степени – фосфатные группы и наиболее слабую – карбонильные группы. Метахромазирующие красители часто используются для гистохимического выявления основного вещества хряща, муцина, гранул тучных клеток и др. [100].

1.4.1. Особенности гистохимических исследований распределения металлов в растениях

Одной из важнейших проблем экологической физиологии растений является изучение ответной реакции растений на ионы тяжелых металлов, которые при повышенных концентрациях оказывают токсическое действие на самые разнообразные физиологические процессы. Данная проблема имеет не только очевидное практическое значение, которое определяется возрастающим загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами, но также имеет и важное фундаментальное значение, которое связано с исследованием механизмов адаптации и устойчивости растений к тяжелым металлам.

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 [110]. В сочетании с методами определения суммарного содержания металлов в органах растений гистохимические методы позволяют выстроить полную картину взаимодействия металла и растения.

Способность растений накапливать тяжелые металлы реализуется на разных уровнях организации: клеточном, тканевом и органном, что связано, прежде всего, со способностью растений накапливать металлы в клеточных оболочках и вакуолях клеток разных тканей и органов, а также с существованием барьерных тканей, ограничивающих передвижение ряда тяжелых металлов [110].

В ранних работах для определения свинца использовали сульфидный метод. Позднее для гистохимического определения металлов стали применять органические нефлуоресцентные и флуоресцентные индикаторы, в 1972 г. впервые был разработан гистохимический метод определения свинца с использованием родизоната натрия. Гистохимический метод определения никеля появился несколько позже. В настоящее время он модифицирован, что позволило повысить его чувствительность. Кроме того, разработаны гистохимические методы определения других тяжелых металлов, а также стронция [110]. Методы активно используются для изучения деталей взаимодействия растений с металлами [102-104, 111].

Для выявления Zn существует ряд методик с использованием флуоресцентных индикаторов ZinQuin, RhodZin-3, FluoZin-1, FluoZin-2, FluoZin-3, IndoZin-1, FuraZin-1, TSQ, NewportGreenPDX и NewportGreenDCF, различающихся по своей специфичности и чувствительности к ионам Zn, а

также по способности проникать через плазматическую мембрану. Для определения Си и Fe, а также Hg, Ni, Cd и Pb используют малоспецифичные флуоресцентные красители PhenGreenSK и PhenGreenFL [110]. Вышеперечисленные флуоресцентные индикаторы применяются, главным образом, в физиологии животных, а в физиологии растений используются при изучении транспорта металлов через клеточные мембраны.

Основные руководящие принципы для разработки гистохимических методов, имеющих цель выявления металлов в тканях растений подробно изложены в [110]:

1. Аналитический реагент должен образовывать окрашенный или флуоресцирующий комплекс с изучаемым металлом, который будет отчетливо виден под микроскопом, так как именно по его распределению можно судить о распределении металла по тканям.
2. Используемый реагент должен обладать высокой чувствительностью и селективностью по отношению к изучаемому металлу.
3. Реагент должен проникать в неповрежденные клетки.
4. Возможность перераспределения металла во время проведения анализа должна быть незначительной, что особенно важно для ионов, поступающих внутрь клетки.
5. При разработке метода данные гистохимического анализа должны быть подтверждены результатами, полученными с помощью альтернативных методов.

Описанные гистохимические методы выявления металлов в тканях растений являются полуколичественными, в ряде случаев – качественными. По интенсивности окрашивания можно судить о накоплении металла в клетках и тканях. Можно также провести сравнительный анализ накопления металла в клеточных оболочках и в протопластах клеток разных тканей. Для идентификации металлов, связанных с материалом клеточных оболочек, а также находящихся в периплазматическом пространстве и на поверхности

протопласта, можно использовать плазмолиз перед проведением гистохимического анализа (рисунок 1.14) [104].



Рисунок 1.14 – Распределение Sr в клетках корня проростков кукурузы после 7 суток инкубации на растворе 3 мМ $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$. ВК – внутренняя кора. Клетки подверглись плазмолизу: виден отошедший от клеточной стенки протопласта, периплазматическое пространство заполнено комплексами родиозоната натрия со стронцием [104].

Анализируя распределение металлов в растущих частях растений необходимо учитывать, что уменьшение интенсивности окрашивания растягивающихся клеток по сравнению с меристематическими свидетельствует лишь об уменьшении содержания металла в растягивающихся клетках в единице объема клетки. Содержание металла в пересчете на клетку может и не уменьшаться или даже увеличиваться в результате его поглощения, например, в зоне растяжения корня.

Гистохимические методы являются незаменимыми для анализа передвижения и распределения металлов в живых тканях растений. Однако, как и любой другой метод, они обладают рядом недостатков:

1. Можно предположить, что этими методами выявляются не все ионы изучаемого металла. Кроме того, большая часть металла находится в клетке в связанном состоянии в виде комплексов с белками, пептидами, углеводами, органическими и аминокислотами. Чтобы повысить чувствительность методов, нами были отобраны реагенты, обладающие наибольшим сродством к изучаемым металлам и подобрана среда, в которой реагент наиболее чувствителен к изучаемым ионам.

2. Большинство аналитических реагентов недостаточно селективны.

Для определения Cd, к сожалению, пока не существует столь селективного аналитического реагента и поэтому при проведении анализа обязательно нужно учитывать наличие в среде мешающих ионов в высоких концентрациях [110].

3. При проведении гистохимического анализа важно учитывать чувствительность метода. Чувствительность гистохимических методов нельзя определить непосредственно на срезах, так как содержание металла в тканях растений очень часто превышает их содержание в питательной среде за счет эффекта концентрирования.

При проведении гистохимического анализа необходимо принимать во внимание, что отсутствие окрашивания тех или иных тканей или органов при инкубации растений на растворах солей тяжелых металлов свидетельствует лишь о том, что содержание металлов в тканях ниже предела определения гистохимического метода. Однако при изучении распределения металлов по тканям растений следует учитывать, что растения способны накапливать металлы в концентрациях, в десятки и даже сотни раз превышающих их содержание в растворе или почве. Следовательно, даже при концентрации металлов в среде на границе или даже ниже предела определения гистохимических методов, содержание металлов в растениях, скорее всего, будет достаточным для изучения их распределения с помощью этих методов.

Гистохимические методы были использованы для определения распределения, накопления и передвижения тяжелых металлов у целого ряда видов растений, относящихся как к исключателям, накапливающим тяжелые металлы преимущественно в подземных органах, так и у гипераккумуляторов, накапливающих тяжелые металлы в больших количествах преимущественно в надземных органах без видимого нарушения метаболизма. Полученные с применением этих методов данные внесли значительный вклад в выяснение роли разных тканей корня и побега растений в передвижении и накоплении тяжелых металлов, что важно для

решения проблемы избирательного накопления тяжелых металлов в подземных органах исключателей и надземных органах гипераккумуляторов. Проведенное картирование передвижения и накопления тяжелых металлов у исключателей и гипераккумуляторов позволило заключить, что роль тканей растений в поступлении, передвижении и накоплении тяжелых металлов неодинакова не только для разных металлов, но и для растений исключателей и гипераккумуляторов, что в свою очередь определяет металло- и тканеспецифичность токсического действия металлов.

Недостатками данных приёмов являются субъективная оценка, основанная на индивидуальном цветовосприятии и невозможность оценить количественные различия в распределении металла даже в пределах одного препарата. В работах [107-108] была сделана попытка преодолеть данные ограничения и разработать метод определения количества никеля в органах растений на основании анализа микрофотографий в пакете программ MatLab. Авторы, анализируя фотографии в пространстве цветов RGB, определили сочетание каналов, в котором цвет комплекса никель-диметилглиоксим будет максимально отличаться от цвета хлорофилла. Используя специально приготовленные агаровые стандарты с известной концентрацией металла в них, была получена зависимость интенсивности окраски комплекса от концентрации металла в срезе. После чего была построена цветовая шкала, показывающая распределение металла в единицах мг/кг массы растения (рисунок 1.15).

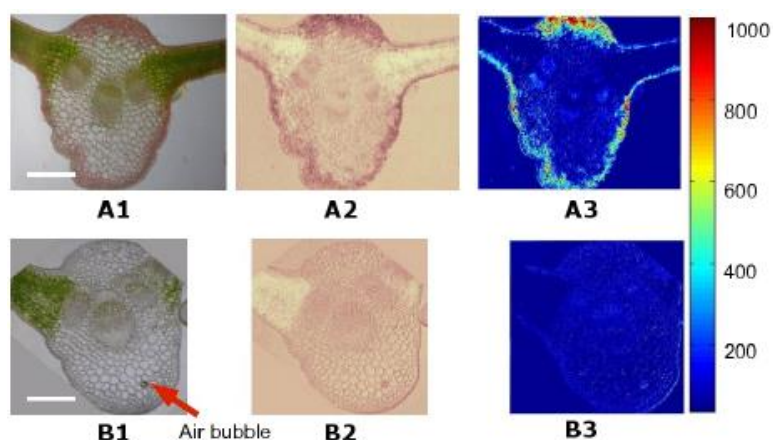


Рисунок 1.15 – Этапы обработки изображения: «сырые» RGB-изображений (A1, B1), интенсивности (A2, B2), калиброванных карт концентрации (A3, B3) (цветовая шкала показывает содержание Ni в мг/кг свежего веса [107])

Аналогичные работы проведены и на других объектах [106, 123]. Так в работе [106] авторы использовали DR5::GUS-трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* L. и предложили методику количественной оценки концентрации ИУК с помощью анализа цифровых микрофотографий. Выявлена эмпирическая квадратическая зависимость между концентрацией ИУК в среде и интенсивностью GUS-зависимого окрашивания. С помощью оригинальной методики установлено, что при развитии латерального перераспределения ауксина в корнях *A. thaliana*, гравистимулированных в течение 90 минут, концентрация ИУК в нижней части корня в зоне растяжения и апикальной меристеме повышается в среднем на 200 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ научно-технической литературы показал, что в последние годы в развитии технологий борьбы с загрязнением окружающей среды широко применяется метод фиторемедиации, успешный опыт его применения в различных климатических зонах. Это энергосберегающая экономичная экотехнология очистки загрязненных стоков с помощью растений. Фиторемедиационные технологии и методы представляют эффективное дополнение, а в некоторых случаях, – альтернативу традиционным технологиям. Наиболее распространенными видами растений для очистки загрязненных вод являются тростник, рогоз и камыш, рдесты гребенчатый и курчавый, элодея, водный гиацинт (эйхорния) и различные представители семейства рясковых. К настоящему времени динамика поглощения различных тяжелых металлов рясковыми, а также влияния различных факторов на процессы поглощения изучены достаточно полно. Однако, особенности взаимодействия рясковых с металлами на морфологическом уровне изучены недостаточно. В литературе практически не изучено воздействие внешних физических полей на процессы фиторемедиации вод от поллютантов. Это направление является весьма перспективным, актуальным и имеет большое практическое и научное значение для дальнейшего развития техники и технологии очистки и

доочистки вод. Приведена эколого-биологическая характеристика и рассмотрены основные представители рода семейства рясовых, их строение, процессы вегетативного размножения и др. Изучены проблемы биоэлектrogenеза растений; пассивный и активный механизмы генерации разности потенциалов на клеточной мембране; процессы использования энергии мембранного потенциала на транспорт ионов через каналы; импульсная электрическая активность у высших растений; биоэлектrogenез рясовых. Рассмотрены гистохимические методы анализа, их использование для определения локализации металлов в тканях и органах растений. Судя по литературным данным, эффективные и простые в использовании гистохимические методы исследования локализации металлов в органах и тканях рясовых не адаптированы и применяются крайне редко. Имеется небольшое количество работ, в которых изучено восстановление (регенерация) рясовых после действия различных антропогенных токсикантов, в том числе, тяжелых металлов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись высшие водные растения: ряска крошечная *L. perpusilla* Torr. и ряска малая *L. minor* L. (рисунок 2.1). Идентификацию видов проводили по [124]. Ряска крошечная обитает в Северной и Южной Америках, некоторых странах Африки и Юго-Восточной Азии и Австралии, на территории РФ не встречается, поэтому использовали аквариумную культуру. Ряска малая широко распространена на территории РФ; для работы растения отбирали в ручье, протекающем в черте города Энгельса.

Рясковые широко распространены по планете, обитают как в холодных, так и в тропических районах, за исключением безводных пустынь и полярных областей. В аридных и чрезвычайно увлажненных районах (Малайзия и Исландия и т.п.) рясковые редки. Встречаются в стоячих, мезо- и эутрофных пресных и солоноватых водоёмах. Большинство видов – нейстонные гидрофиты. Индикаторы трофности. Оптимальная температура для роста лежит в интервале от 25 до 31 °С. Хорошо развиваются при pH среды от 4.5 до 7.5. Размножаются преимущественно вегетативно [124].

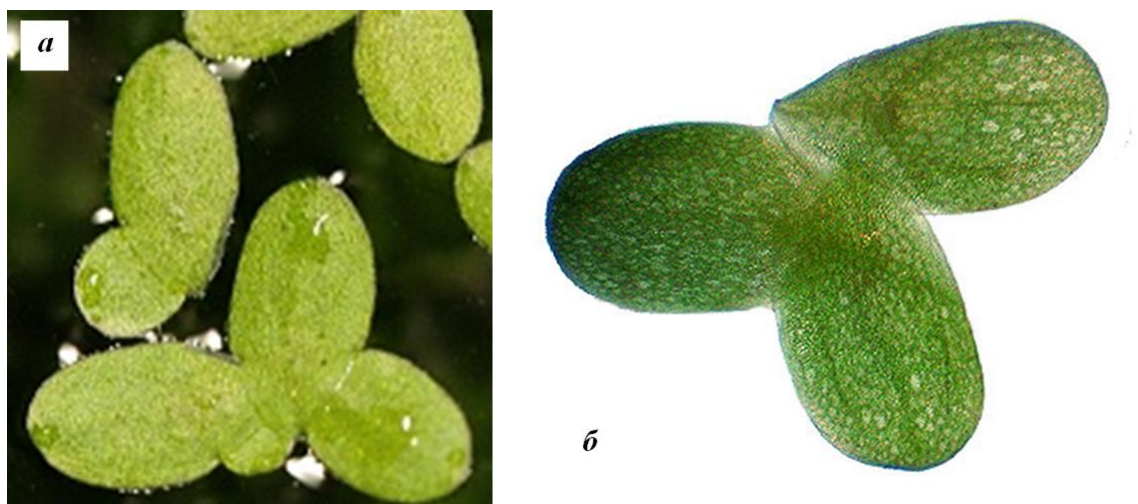


Рисунок 2.1 – Ряска: а-крошечная, б-малая

Для проведения эксперимента растения выращивались на среде Хогланда [125]. Для её приготовления к 1 литру раствора макросолей (в г/л: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,246; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,543; KH_2PO_4 – 0,07; KNO_3 – 0,25)

добавляли 0,5 мл раствора микросолей (в г/л: H_3BO_3 – 2,86; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,82; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,09; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,09) и 20 мл раствора хлорида железа II (в г/250 мл: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,121; Трилон Б – 0,375). pH доводили до 5,8 с помощью 1 М NaOH или 1 М HCl.

Культивирование проводили в нестерильных условиях, в стеклянных емкостях при комбинированном освещении и температуре 23 ± 2 °C. Раз в неделю производилась замена питательной среды.

2.1.2. Приготовление рабочих растворов солей тяжёлых металлов

Для исследования действия ионов тяжелых металлов (ИТМ) на ряску, а также их распределения в растении использовали растворы следующих солей с концентрациями 0,1, 1, 3, 5, 8, 10 мг/л: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $3\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$. Навески солей растворяли либо в дистиллированной воде, либо в той же питательной среде, которая использовалась для культивирования ряски, создавая требуемые концентрации ИТМ.

Для исследования совместного действия ионов кальция и некоторых тяжелых металлов на ряску готовились растворы с равным содержанием (1 и 10 мг/л) ИТМ. При этом использовалась соль кальция, которая шла на приготовление питательной среды Хогланда [125].

Для определения устойчивости ряски крошечной к тяжелым металлам пересаживали растения в количестве 20 листочков на чашки Петри в среду Хогланда с растворенными в ней навесками солей металлов, в контрольные чашки соли не добавляли. Подсчет количества листочков производили в течение 12 суток, отмечали изменения внешнего вида растений: развитие хлороза, некроза. Рассчитывали показатели роста:

время удвоения количества листочков

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}, \quad (2.1)$$

где μ – средняя скорость роста (сут^{-1}) равная

$$\frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i} \quad (2.2)$$

где N_i – количество листецов в начале (20), N_j –общее количество листецов на j -й день наблюдения, t_i –время (сутки) начала наблюдений (0), t_j –время (сутки) от начала наблюдений [126].

Повторность в опыте и контроле 3-5 кратная.

2.1.3. Приготовление рабочих растворов для гистохимических исследований

Для выявления в растительных тканях ряски свинца и кадмия использовали раствор дитизона в смеси ацетон:дистиллированная вода в соотношении 3:1, для повышения чувствительности реакции добавляли 1-2 капли концентрированной уксусной кислоты. Хранению не подлежит. Цвет комплекса со свинцом и кадмием – красный. Для выявления локализации никеля применялся 1% раствор диметилглиоксима в 1,5% растворе гидроксида натрия на 0,05 М растворе натрия тетраборнокислого [110].

2.1.4. Приготовление препаратов для микроскопирования

Листецы/группа извлекались из раствора металла, жидкость с поверхности удалялась фильтровальной бумагой и растение целиком помещалось в реагент нижней (вентральной) стороной вверх на 1-2 мин. На предметное стекло наносили 3-4 капли реагента (п. 2.1.4). После этого листец(ы) помещали на стекло в реагент перевернув его нижней (вентральной) поверхностью вверх, накрывали покровным стеклом и анализировали на микроскопе «МИНИМЕД-502» при 40-, 100- и 400-кратных увеличениях.

2.1.5. Стерилизация листецов ряски малой

Листецы ряски малой, отобранные из естественного водоёма, содержат на своей поверхности многочисленные клетки диатомовых водорослей [127], бактерий, механические загрязнения (рисунок 2.2).

При помещении таких растений на питательную среду наблюдается стремительный рост бактериальной и грибной инфекции [87]. Для обеззараживания растений использовался 4 % раствор гипохлорита натрия: листецы погружали в гипохлорит на 4 минут, после чего промывали дистиллированной водой и помещали на питательную среду [87].

На питательной среде наблюдали развитие хлороза/некроза у материнских листецов, дочерние оставались зелёными в проксимальной части, у основания, в то время как их дистальная часть также подвергалась хлорозу/некрозу. В дальнейшем именно такие дочерние листецы дали начало новым группа листецов ряски (рисунок 2.3).

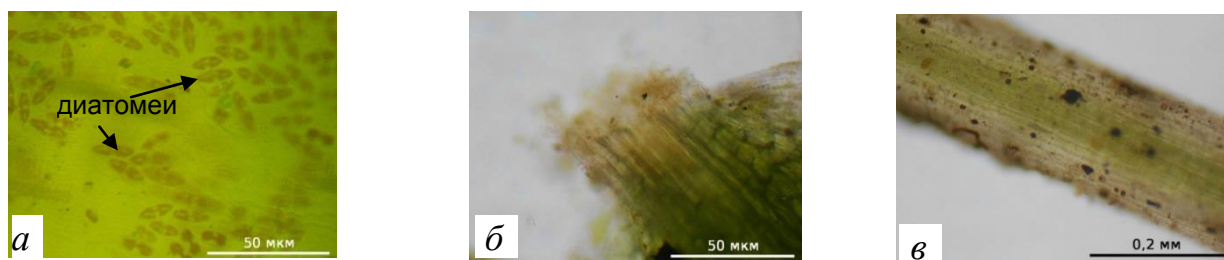


Рисунок 2.2 – Поверхность листецов ряски малой из естественного источника: *а* – видны клетки диатомовых водорослей на нижней поверхности листеца; *б* – черешок; *в* – поверхность корня с разнообразными загрязнениями



Рисунок 2.3 – Ряска малая после стерилизации: *а* – общий вид листецов: обесцвеченные/бурые материнские листецы и зелёные в основании дочерние (3 суток); *б* – отдельные группы, сформировавшиеся из выживших дочерних листецов (10 суток)

Листецы были свободны от диатомовых водорослей и загрязнений (рисунок 2.4).



Рисунок 2.4 – Поверхность – *а*, корень – *б* и черешок – *в* листецов ряски малой после стерилизации

2.1.6. Приготовление растворов для изучения анатомии листецов ряски

Для изучения деталей анатомии листецов ряски использовали растворы [128]: 70% спирт (готовили разведением дистиллированной водой из 96%-го), 5% гипохлорит натрия (готовили разведением дистиллированной водой из 19%-го), раствор сафранина в алюмокалиевых квасцах. Последний получали следующим образом. В 100 мл дистиллированной воды помещали 1 г сафранина и 5 г алюмокалиевых квасцов, взбалтывали. Ёмкость со смесью нагревали на водяной бане в течение 1 часа, полученный раствор фильтровали.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Воздействие внешних физических факторов

Исследовали влияние различных внешних физических воздействий (ВФВ: постоянное магнитное поле (ПМП), УФ-излучение) на процессы роста и размножения растений ряски.

Воздействие ультрафиолетового излучения на размножение ряски

Для изучения влияния ультрафиолета на рост ряски крошечной использовали лампу бактерицидную ОБПе, 3х30 Вт, с постоянным УФ-С излучением длиной волны $\lambda=253,7$ нм (рисунок 2.5). Для эксперимента отбирали 20 листецов ряски, пересаживали их в чашки Петри на питательную среду Хогланда. Опытные чашки помещали под лампу на расстоянии 45 см [129-130]. Облучение проводили на протяжении 9 суток в течение 30, 60 и 90 секунд каждые сутки, а также однократно в течение 3 и 5 минут. Контроль воздействию УФ не подвергали. Влияние УФ оценивали, производя подсчет листецов, а также отмечая изменения во внешнем виде растений в течение 9 суток. Потери питательной среды, вызванные испарением, возмещались до начального уровня раз в 2-3 дня. Повторность в опыте и контроле 3-5 кратная.

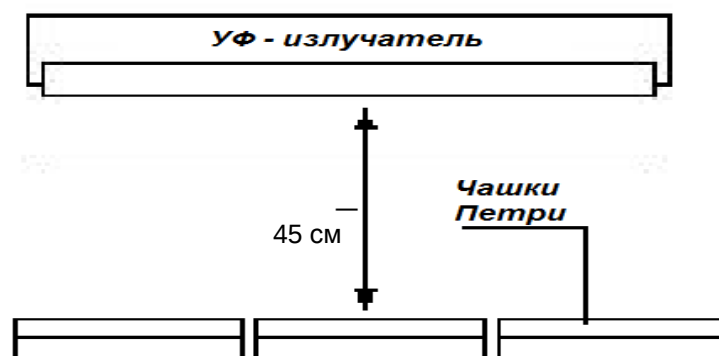


Рисунок 2.5 – Схема воздействия УФ излучения

Воздействие постоянных магнитных полей на размножение ряски

Воздействие постоянным магнитным полем напряженностью 2 и 4 кА/м создавали с помощью источника питания постоянного тока Б5-43, подключенного к медной катушке (рисунок 2.6). Для усиления и концентрирования поля катушку устанавливали на металлические пластины.

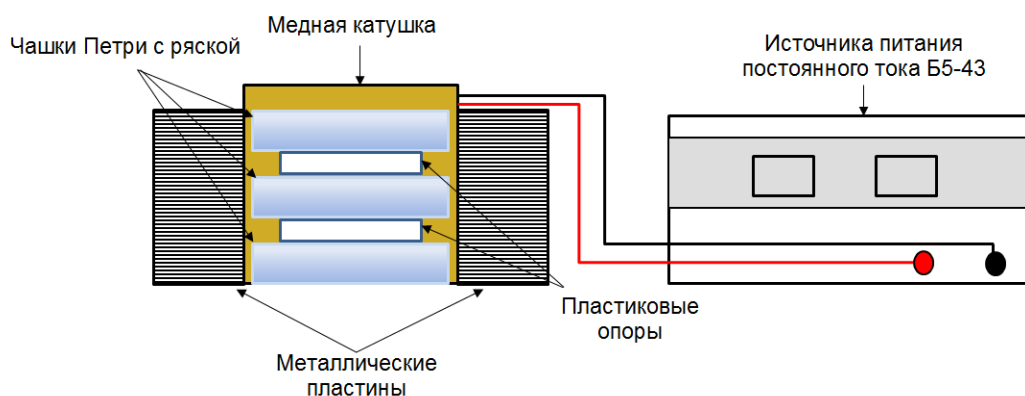


Рисунок 2.6 – Схема установки с постоянными магнитными полями

Напряженность создаваемого магнитного поля вычисляли по формуле:

$$H = \frac{I \times N}{l}, \quad (2.1)$$

где I – сила тока, задаётся на источнике тока, А, N – число витков катушки, 320, l – зазор между пластинами, 0,13 м.

Для эксперимента отбирали по 20 листочков ряски, пересаживали их в чашки Петри на питательную среду Хогланда, чашки помещали в зазор между пластинами установки постоянного магнитного поля на срок 1, 3, 6 и 24 часа. Контрольные растения воздействию ПМП не подвергали. Влияние поля оценивали, производя подсчет листочков, а также отмечая изменения во внешнем виде растений в течение последующих 9 суток. Потери питательной

среды, вызванные испарением, возмещались до начального уровня раз в 2 - 3 дня. Повторность в опыте и контроле 3-х кратная.

2.2.2. Микроструктурные исследования

Микроструктурные исследования растений, подвергнутых воздействию различных факторов (ионы тяжелых металлов, магнитные поля, УФ-излучение и др.) проводили на микроскопе «МИНИМЕД-502» при 40-, 100- и 400-кратных увеличениях. Ряска крошечная в качестве модельного объекта была выбрана из-за малой толщины её листочков ~ 150 мкм – они по этому параметру примерно соответствуют срезу, который можно сделать от руки бритвой. При использовании целых листочков отсутствуют повреждения клеток, что исключает возникновение артефактов из-за вытекания клеточного содержимого. Характер распределения металлов в органах и тканях ряски осуществляли следующим образом. 30 групп листочков ряски (материнский организм и 1-3 дочерних листочка) пересаживали с питательной среды в чашки Петри с растворами солей металлов с концентрацией катиона 0,1 и 1,0 мг/л. Растения для анализа отбирали через 15, 30 минут, 1–6 часов, а также каждые 24 часа в течение 7 суток после начала наблюдений. Контролем являлись растения, культивированные на питательной среде и обработанные по методике [п. 2.1.5]. Так как в контроле после обработки дитизоном наблюдалось слабое окрашивание корневого кармашка (рисунок 2.7 а), исследование проводили, используя растворы металлов на дистиллированной воде, чтобы избежать возможных артефактов. Непосредственное исследование проводили, как описано в п. 2.1.5.

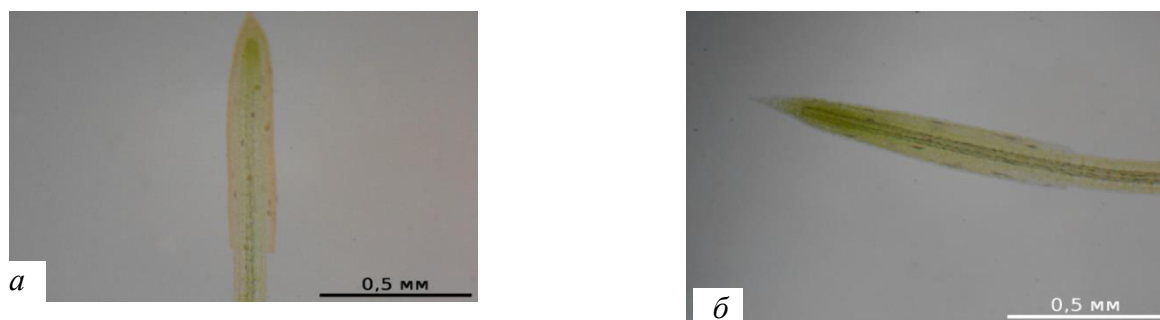


Рисунок 2.7 – Корневые кармашки ряски крошечной, взятой из питательной среды и окрашенные: а) – дитизоном; б) – диэтилдитиокарбаматом натрия

Фотографии препаратов делали с помощью цифрового фотоаппарата. Масштаб определяли с помощью объект-микрометра отраженного света ОМО. Снимки обрабатывались на компьютере с использованием программ Gimp 2.8, ImageJ.

2.2.3. Измерение размеров листецов и площадей групп ряски с помощью программы ImageJ

Оценку влияния тяжелых металлов на длину и ширину листецов ряски крошечной осуществляли следующим образом. По истечению эксперимента (на 12 сутки) случайным образом отбирали 20 групп растений из опытных чашек (содержащих ИТМ в среде) и 20 групп из контрольных вариантов. Листецы обрабатывали по методике, описанной в п. 2.1.5. Полученные фотографии загружали в программу ImageJ.

Для установления связи между реальной единицей длины (мм) и размерами пикселя на фотографии растения использовали фотографию объект-микрометра отраженного света ОМО, полученную при том же увеличении микроскопа, которое использовалось при получении фотографии листеца. Определив расстояние в пикселях, которое соответствует 1 мм, эти данные заносили в масштаб через меню **Analyze > Set scale**.

Затем инструментом **Straight** проводили линии, соответствующие длине и ширине листеца, и добавляли их в информационное окно менеджера выделений **ROI Manager** (меню **Analyze > Tools > ROI Manager**.)

Непосредственное измерение размеров листеца осуществлялось по нажатию на кнопку **Measure** в окне **ROI Manager**'а: открывалось окно **Results**, в столбце **Length** которого содержались искомые значения (в мм) (рисунок 2.8). Данные экспортировались в файл с расширением *.xls командой **File > Save as...** для дальнейшей обработки в программе Microsoft Office Excel 2010.

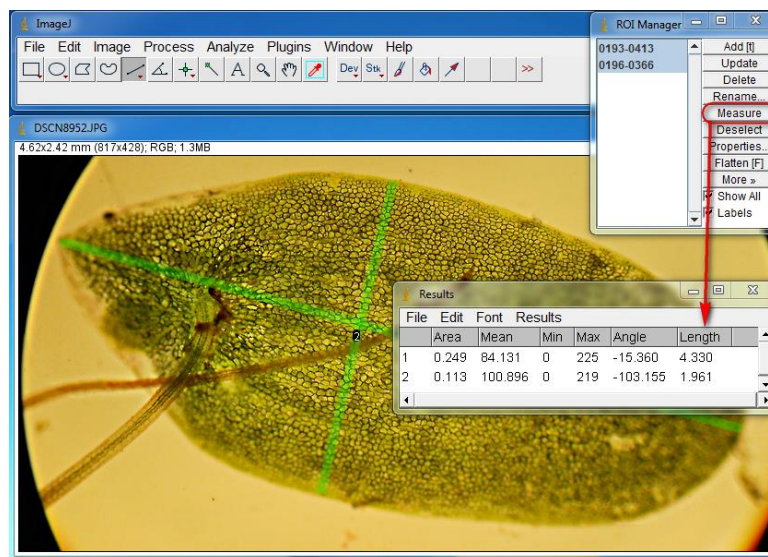


Рисунок 2.8 – Результаты измерения размеров листеца в программе ImageJ

Для определения суммарной видимой площади, занимаемой листецами ряски в чашке Петри, поступали следующим образом. Группы листецов фотографировались на тёмном, контрастном фоне, фотографии загружались в программу ImageJ. Настраивались контраст/яркость для максимизации различий цвета листецов и фона инструментом **Brightness/Contrast** (меню **Image > Adjust**).

Для установления связи между реальной единицей длины (мм) и размерами пикселя на фотографии использовали фрагмент масштабной координатной чертёжной бумаги. Инструментом **Color Threshold** (меню **Image > Adjust**) отделяли по цвету листецы от тёмного фона, после чего выделяли инструментом «волшебная палочка» Wand tool все листецы.

Далее с помощью менеджера выделений **ROI Manager** определяли площади каждой группы. Данные экспортировались в файл с расширением *.xls командой **File > Save as...** для дальнейшей обработки в программе Microsoft Office Excel 2010.

2.2.4. Оценка степени хлороза листецов ряски по фотографиям

Для количественной оценки степени развития хлороза листецов в процессе пребывания в растворах металлов использовали компьютерный анализ фотографий. Установлено, что имеются корреляции, связи между содержанием хлорофилла в листьях и яркостью цветовых каналов на

фотографиях, полученных с этих листьев [131-135]. Растровые графические файлы (например, файлы фотографий) представляют собой совокупность структурных единиц – пикселей (от англ. «picture element»), каждый из которых имеет координату и цвет. Координата пикселя задаётся от верхнего левого угла файла, а цвет – сложением некоторых основных цветов. Чаще всего для этого используют модель RGB (Red, Green, Blue – Красный, Зелёный, Синий), в которой цвет пикселя – это результат сложения трёх цветов: красного, зеленого и синего. Такие основные, базовые цвета называют ещё каналами. Яркость каждого канала может быть от 0 (отсутствие данного цвета в результирующем цвете пикселя) до 255 (максимальная яркость канала в цвете пикселя). Тогда можно измеряя среднюю яркость канала (например, зеленого) на фотографии количественно оценивать интенсивность зелёной окраски (и степень хлороза) листецов ряски в разных условиях.

Для этого чашки с листецами ряски, установленные на темном фоне, фотографировали цифровым фотоаппаратом с фиксированной светочувствительностью ISO 100, разрешением 4096x3072, с расстояния ~ 10 см. Свет в помещении при этом был искусственный, 300 лк, источник – потолочные лампы дневного света. Полученные фотографии в виде сжатых JPG-файлов загружали в компьютер и обрабатывали в программе ImageJ. Обработка заключалась в выделении изображений листецов и замене фона на чёрный цвет. После этого с помощью инструмента Histogram получали данные о средней интенсивности каждого канала: красного, зелёного и синего. Результаты заносили в программу Excel 2010 и вычисляли суммарную яркость листецов:

$$\Sigma \text{яркость} = \text{яркость R} + \text{яркость G} + \text{яркость B} \quad (2.4)$$

и долю каждого канала:

$$\text{Канал, \%} = \frac{\text{яркость канала}}{\Sigma \text{яркость}} \quad (2.5)$$

а также статистические характеристики выборок с помощью надстройки «Описательная статистика».

2.2.5. Изучение анатомии листецов ряски

Изучение особенностей анатомического строения листецов ряски проводили, как описано [128]. Листецы помещали в избыток 70 % спирта и кипятили 2 минуты, после чего листецы отмывали в свежем 70 % растворе спирта при комнатной температуре. Затем растения переносили в 5 % раствор гипохлорита натрия (п. 2.1.6) до полной потери ими окраски. По достижении прозрачности листецы два раза промывали в дистиллированной воде по 2 минуты каждый раз. Промытые растения помещали в раствор сафранина (п. 2.1.6), плотно закрывали и оставляли на ночь. На следующий день листецы несколько раз промывали дистиллированной водой для удаления избытка красителя и рассматривали под микроскопом.

2.2.6. Влияние тяжелых металлов, магнитного поля и УФ-излучения на проницаемость мембран листецов ряски кондуктометрическим методом

Действие металлов и внешних физических воздействий на проницаемость клеточных мембран листецов ряски оценивали по проводимости водной вытяжки с помощью портативного кондуктометра марки HANNA.

Для изучения влияния **постоянного магнитного поля и УФ-излучения** на состояние мембран листецов на аналитических весах взвешивали 100 мг листецов, помещали навеску в химические стаканы со 100 мл бидистиллированной воды, проводимость которой определялась перед переносом в неё ряски. Опытные варианты подвергались действию ПМП напряженностью 2 кА/м в течение 3 часов и УФ-излучения в течение 5 минут, контрольные образцы ряски физическим воздействиям не подвергали. Через 6 часов определяли проводимость вытяжки. Количество электролитов, вышедших из ряски, представляло собой разность между конечной проводимостью вытяжки и проводимости бидистиллированной

воды, определенной перед переносом в неё ряски. Повторность в опытах и контролях 3-х кратная.

2.2.7. Методика измерения поверхностного потенциала листецов ряски

Для измерения поверхностного потенциала листецов ряски применяли иономер И-500 в режиме фиксации потенциала. Измерительным электродом служил платиновый электрод ЭПЛ-02, электродом сравнения – хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1М в 1н растворе KCl. Группу листецов ряски (2 листеца: крупный материнский и развивающийся дочерний) помещали в раствор соли металла. К поверхности материнского листеца подводили платиновый электрод, закрепленный на штативе. Контакт электрода и раствора не допускался. Ячейка электрода сравнения, заполненная 1 н раствором KCl, соединялась с измерительной ячейкой солевым мостиком (рисунок 2.9). Повторность измерений 5-6 кратная.

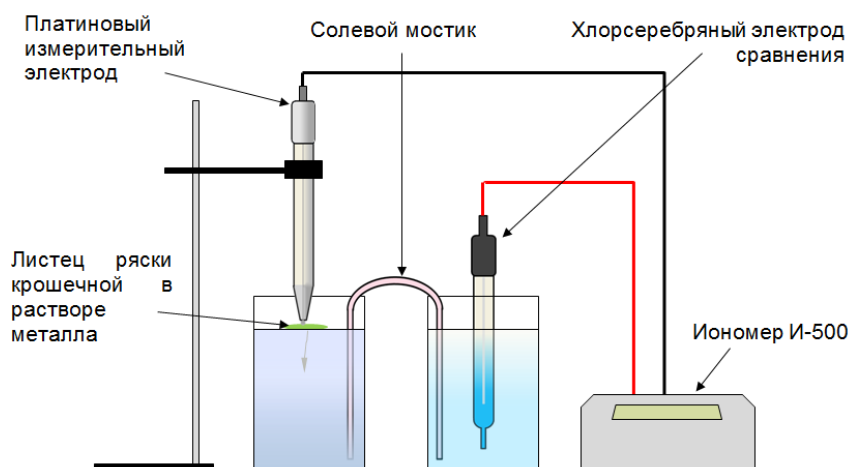


Рисунок 2.9 – Схема измерения поверхностного потенциала листецов ряски

2.2.8. Проведение количественного анализа природной воды

Количественный анализ природной воды на содержание ионов меди, свинца и кадмия проводили методом инверсионной хроновольтамперометрии с помощью анализатора «Экотест-ВА», входящего в комплект роботизированного комплекса «Экспертиза ВА-2D» с электродом «З в 1» по соответствующей методике к прибору. Пробы воды объемом 100 мл фильтровали через бумажный фильтр, затем к ним добавляли 2 мл

концентрированной азотной кислоты и выпаривали до образования белого осадка. В случае необходимости, если осадок имел серый цвет, к нему добавляли 1 мл 1 М соляной кислоты и выпаривали повторно. Осадок растворяли в 100 мл буферного раствора, получившуюся пробу анализировали на приборе.

Инверсионный вольтамперометрический анализ основан на электрохимическом накоплении определяемых элементов на поверхности рабочего электрода в виде амальгамы при заданном потенциале поляризации с последующей количественной оценкой величин их анодных токов электрорастворения (окисления), имеющих вид пиков на вольтамперограмме [136-138]. Высота (площадь) пика пропорциональна концентрации иона металла в растворе электролита. При наличии в исследуемом растворе нескольких электрохимически активных ионов, с достаточно отличающимися стандартными потенциалами, вольтамперограмма представляет собой совокупность разрешенных пиков, которую можно использовать для качественного и количественного анализа.

Определение проводили по методу добавок стандартного раствора. Метод добавок включает регистрацию вольтамперограмм при одних и тех же параметрах измерений следующих растворов: раствора контрольной пробы, анализируемого раствора пробы, анализируемого раствора пробы с добавками стандартных растворов измеряемых элементов. Содержание ионов металла в анализируемом растворе пробы рассчитывали по величинам аналитических сигналов вольтамперограмм, анализируемого раствора пробы и анализируемого раствора пробы с добавками стандартных растворов.

Комбинированный электрод «3 в 1» - это целая вольтамперометрическая электродная система в едином корпусе. Все электроды (рабочий, вспомогательный и ключ от электрода сравнения) расположены в одной плоскости на торце датчика.

Количественный анализ природной воды на содержание ионов никеля проводили фотоколориметрическим методом с диметилглиоксимом [139].

Пробы воды объемом 100 мл минерализовались как описано выше. Затем 10 мл минерализованной пробы переносили в колбу на 25 мл, добавляли 10 мл 5 % раствора персульфата аммония, 3 мл концентрированного аммиака, 1 мл 1 % спиртового раствора диметилглиоксима, доводили объем до метки дистиллированной водой, перемешивали. Через 10 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Промэколаб ПЭ – 5300 В при длине волны $\lambda=445$ нм против нулевой пробы, которая готовилась в колбе на 25 мл и содержала все те же реактивы, кроме ионов никеля.

2.2.9. Статистический анализ результатов

Количественные данные обрабатывали статистически в программах Microsoft Office Excel 2010 с использованием встроенных статистических функций и надстройки «Анализ данных» и PAST v. 2.17с [140]. Проверку выборок на нормальность распределения проводили по критерию Шапиро-Уилка W в программе PAST v. 2.17с, равенство дисперсий оценивали по критерию Левене. Для оценки значимости различий средних в выборках с нормальным распределением применяли дисперсионный анализ и критерий Тьюки Q для множественного сравнения. В случае если предварительный анализ по критериям Шапиро-Уилка W и Левене показал отсутствие параметра нормального распределения и равенства дисперсий, использовали непараметрические критерии: Крускала-Уоллиса H и Данна Q . На основе результатов экспериментов вычисляли эмпирические критерии достоверности, которые сравнивали с табличными значениями при соответствующих степенях свободы и уровне значимости $\alpha = 0,05$ [141-145].

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (КАДМИЯ, МЕДИ И НИКЕЛЯ) ВЕГЕТАТИВНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ И МОРФОЛОГИЮ РАСТЕНИЙ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ

Тяжелые металлы играют важную роль в жизнедеятельности растений. Многие из них являются микроэлементами (медь, никель, кобальт, цинк и др.), участвующие в самых разнообразных физиологических процессах: от фотосинтеза до регуляции активности генов. Однако значительные концентрации микроэлементов способны вызвать патологические изменения в клетках: образование активных форм кислорода, окислительный стресс и т. д. Для ряда металлов (кадмий, ртуть, свинец, серебро) не выявлены жизненно необходимые функции, кроме деструктивных [16]. В водной среде подвижность, биодоступность металлов выше, чем в почве [113-114]. В литературном обзоре отмечалась способность растений семейства рясковых к извлечению и накоплению значительных количеств металлов. Эта особенность растений активно используется в технологии очистки стоков. Кроме этого, в связи с возросшим количеством сточных вод, содержащих тяжелые металлы, сбрасываемых в природные водные объекты, проблема влияния металлов на растения в целом является актуальной и важной как с точки зрения биологии растений, так и с точки зрения практики очистки стоков.

Выбор и внедрение новых фиторемедиационных агентов для очистки стоков требует предварительного изучения взаимодействия растительного организма и токсиканта, выявления характерных признаков его влияния на различных структурных уровнях: организменном, популяционном и т. д. Нами было проведено исследование влияния меди, никеля и кадмия на скорость вегетативного размножения ряски крошечной и размеры отдельных листочков. Судя по литературным данным, ряска крошечная не так активно используется в экспериментальной практике по изучению сорбции поллютантов из водных сред, как другие виды рясковых. Также можно отметить, что для гистохимического анализа накопления металлов в тканях и

органах листецов растения этого вида подходят лучше, чем, например, ряски малой из-за малой толщины листецов (0,32 мм).

3.1. Влияние кадмия, меди и никеля на вегетативное размножение ряски крошечной

При действии тяжелых металлов в концентрациях в десятки раз превышающие ПДК для природных вод [146] было установлено, что наибольшим токсическим эффектом обладают ионы кадмия (II) (рисунок 3.1): концентрация в 1 мг/л вызывала значимое снижение скорости роста и времени удвоения листецов на 24 % ($p < 0,001$, $Q = 8,667$). Концентрация кадмия в 5 мг/л привела к полной гибели растений, присутствие в среде 3 мг/л металла вызвало гибель практически всей популяции, к 12 суткам оставались лишь мелкие, не более 1 мм в диаметре почки, соединенные с мертвыми некротизированными материнскими листецами (рисунок 3.2).

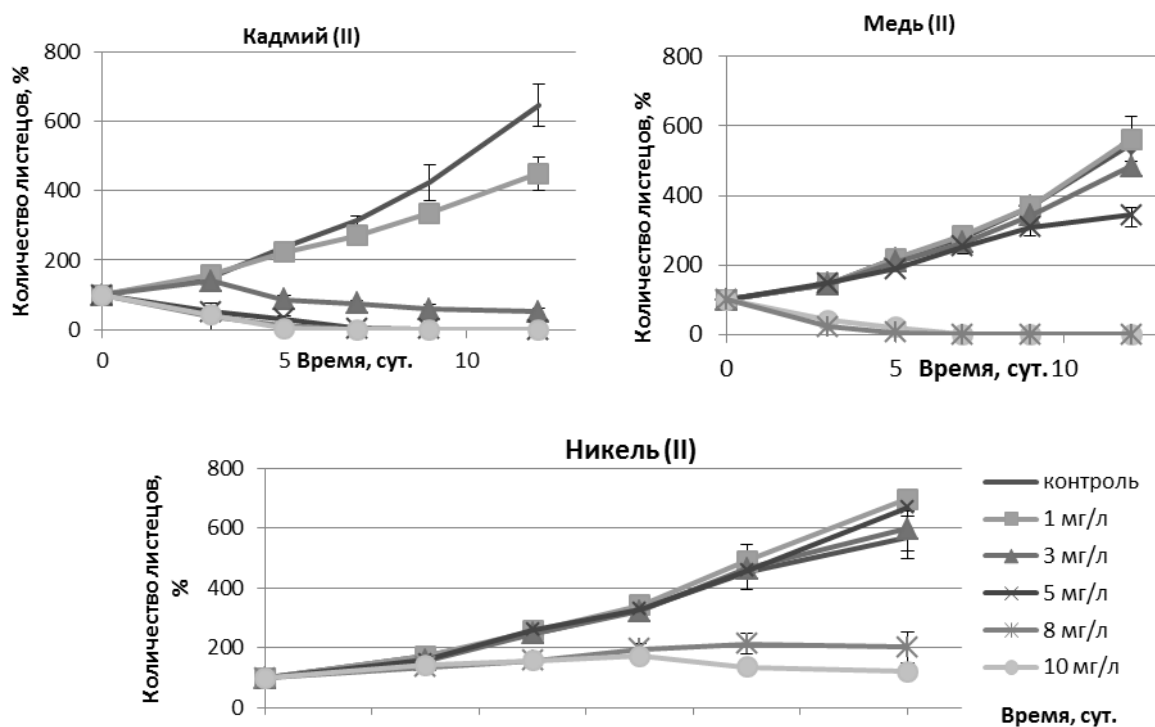


Рисунок 3.1 – Динамика численности популяций ряски при действии различных концентраций ионов металлов. Представлены средние значения и их стандартные отклонения

В культуре с 3 мг Cu^{2+} в литре питательной среды у старых листецов были отмечены признаки хлороза, но скорость размножения в этом случае значимо не отличалась от контроля ($p=0,922$, $Q=0,546$). При 5 мг/л показатель снизились на 63 % ($p<0,001$, $Q=23,17$) по сравнению с контролем. Также отмечались некрозы и гибель взрослых пересаженных листецов.

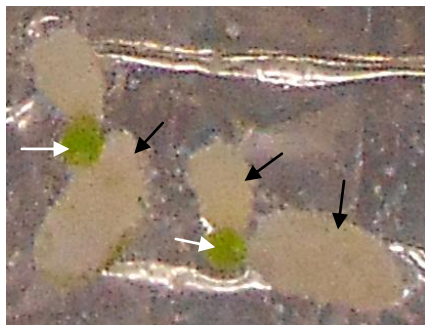


Рисунок 3.2 – Внешний вид листецов и почек на 12 сутки в присутствии кадмия, $\text{C} = 3$ мг/л: черными стрелками отмечены погибшие материнские листецы; белыми – живые почки

Никель показал наименьшую токсичность для ряски крошечной из трех исследованных металлов. В диапазоне концентраций от 1 до 5 мг/л он не вызвал статистически значимых снижения скорости роста и времени удвоения листецов (рисунок 3.1; $p=0,185$, $Q=3,208$ – для варианта 5 мг/л). Только при концентрации 8 мг/л в культуральной среде этот металл вызвал снижение скорости вегетативного размножения в 1,23 раза ($p<0,001$, $Q=9,807$), а при концентрации 10 мг/л скорость размножения лишь несколько превышала гибель растений. Кроме этого, никель в столь высоких концентрациях повлиял на морфологию растущих листецов (рисунок 3.3). Было обнаружено, что у молодых, развивающихся листецов, формируется характерная зона некроза, своего рода перетяжка в центре листеца, либо вблизи основания, в проксимальной части. Микроструктурные исследования с применением раствора диметилглиоксима для обнаружения никеля в тканях показали, что металл часто локализуется именно в этих зонах. Также металл был обнаружен в корнях и черешках (рисунок 3.4). Следует отметить, что вариантах с кадмием и медью эти металлы гистохимически в листецах не

выявлялись (отсутствовало характерное окрашивание при обработке соответствующим реагентом)



Рисунок 3.3 – Морфология листочков на среде с Ni^{2+} : а) 8 мг/л; б) 10 мг/л

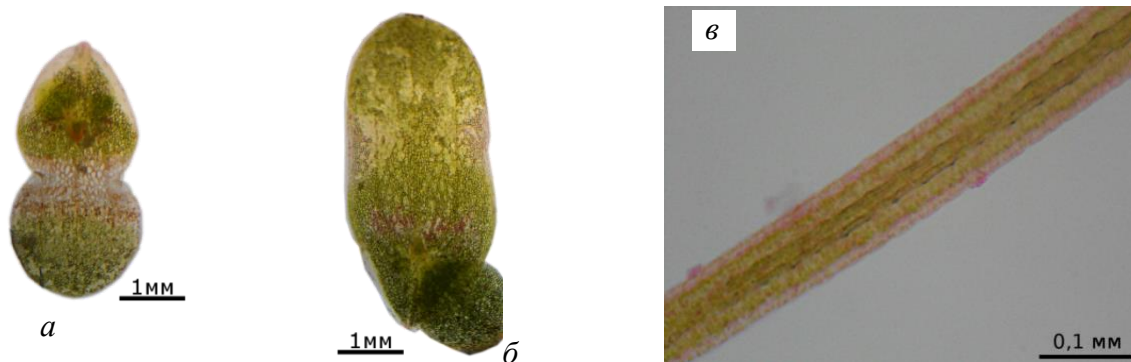


Рисунок 3.4 – Микрофотографии листочков после культивирования в среде с Ni^{2+} : а – дочерний листец, $C_{\text{Ni}} = 8$ мг/л; б – материнский листец, $C_{\text{Ni}} = 8$ мг/л; в – корень, $C_{\text{Ni}} = 10$ мг/л. Красное окрашивание свидетельствует о наличии Ni^{2+}

Таким образом, было установлено, что минимальные концентрации металлов, при которых наблюдаются значимые и видимые изменения популяции ряски крошечной, составляют: для кадмия – 1 мг/л, для меди – 5 мг/л, для никеля – 8 мг/л. Полученный нами ряд токсичности металлов: $\text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cd}$ – в целом соответствует литературным данным [6].

3.2. Оценка изменения общей площади популяции ряски

В работах, посвященных изучению особенностей размножения рясковых на различных средах, в том числе и с токсикантами, часто используют различные способы оценки скорости роста: простой подсчет количества листочков и почек, определение сырой/сухой биомассы и суммарной площади листочков [87, 126, 147]. Как правило, для инокуляции используют несколько групп (4-6), каждая из которых состоит из 2-3

листецов. Каждый листец несет почечные кармашки с молодыми почками/листецами, которые становятся видимыми через несколько часов после начала эксперимента. Поэтому в первые дни средняя скорость роста количества листецов значительно опережать скорость роста общей площади листецов. Темпы роста общей площади растений могут быть более стабильны в течение всего теста.

Выше было показано, что никель обладает наименьшей токсичностью в отношении популяции ряски крошечной, хотя и вызывает заметные изменения морфологии отдельных листецов. Поэтому нами было проведено сравнение влияния никеля в разных концентрациях на изменение суммарной площади листецов с данными, полученными прямым подсчетом растений.

Первоначальные площади листецов в разных растворах статистически не различались между собой ($p=0,407$, $H=2,897$) (рисунок 3.5), одинаковым было и их количество – 20 штук на чашку Петри ($n = 3$).

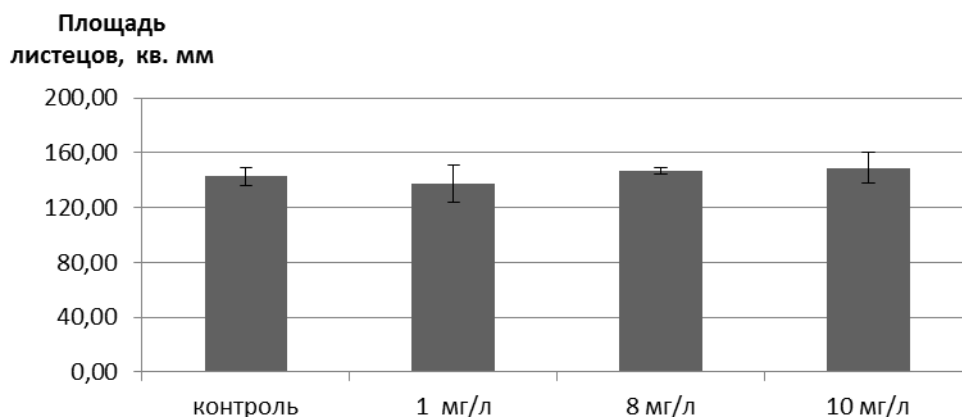


Рисунок 3.5 – Начальные площади листецов, представлены средние значения и их стандартные отклонения ($n=3$).

На 12 сутки были измерены площади групп листецов ряски и общее количество листецов (рисунок 3.6).

Результаты статистического анализа показали, что прямой подсчет количества листецов и измерение площадей растений дают одинаковый результат на качественном уровне: количество листецов и общая площадь в контроле и в варианте с 1 мг/л никеля не отличаются ($p=0,208$, $Q=3,085$). Это означает, что никель в такой концентрации не повлиял на скорость вегетативного размножения и формирование поверхности растений.

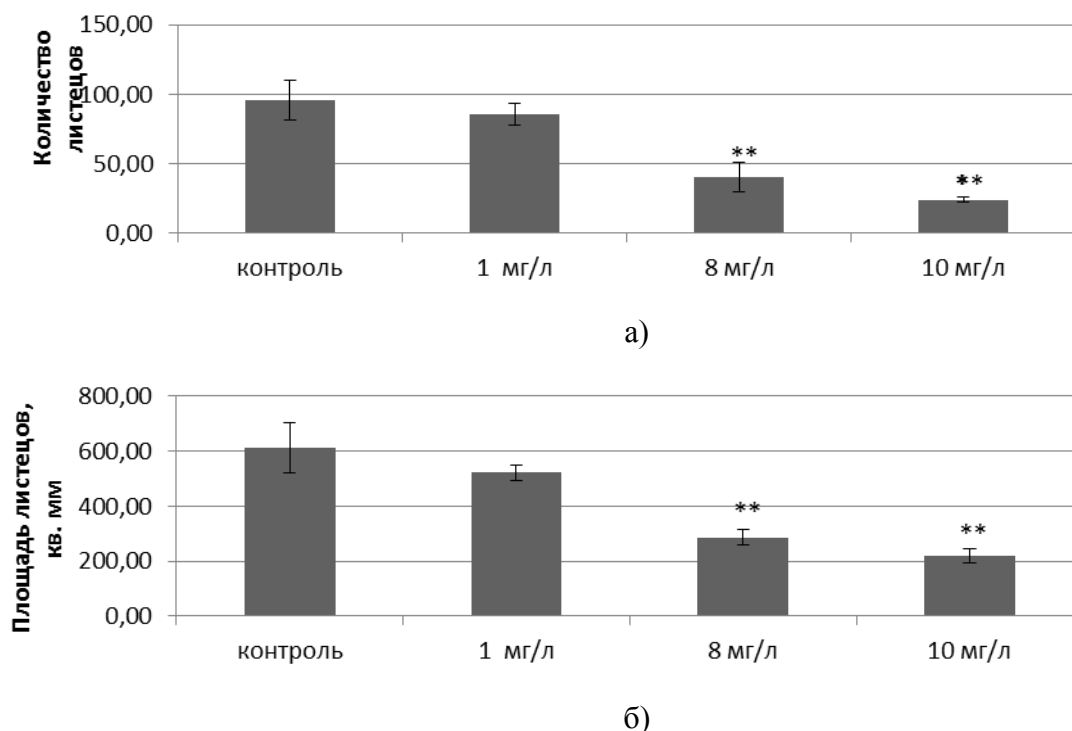


Рисунок 3.6 – Количество листочков (а) и общая площадь листочков (б), выращенных на среде Ni^{2+} на 12 сутки. Представлены средние значения и их стандартные отклонения ($n=3$). Знаком * отмечены значимые различия с контролем

Никель в высоких концентрациях (8 и 10 мг/л) достоверно снизил как скорость размножения, так и площадь поверхности ($p<0,001$, $Q=11,09$ – 8 мг/л; $p<0,001$, $Q=13,34$ – 10 мг/л). При этом в варианте 10 мг/л изучаемые показатели значимо не отличались от 8 мг/л ($p<0,435$, $Q=2,247$).

Таким образом, можно заключить, что простой подсчет листочков отражает интенсивность действия токсиканта наряду с более трудоёмким определением суммарной площади листочков.

3.3. Влияние кадмия, меди и никеля на линейные размеры листочков ряски крошечной

Тяжелые металлы влияют на многие функции и процессы в растительных клетках. В частности, кадмий ингибирует митотический индекс, вызывает индукцию хромосомных мутаций, повреждает ДНК в клетках лука [31]. Также известно, что линейные размеры листочков ряски малой *L. minor* варьируют в зависимости от условий роста – степени загрязнения естественных водных объектов [148]: по мере увеличения токсикантов в среде происходит уменьшение длины и ширины листочков,

длины корня. В связи с этим исследовались влияния кадмия, меди и никеля на линейные размеры листецов ряски крошечной, сформировавшихся на питательной среде в присутствии этих металлов.

Результаты по влиянию Cu^{2+} представлены на рисунке 3.7.

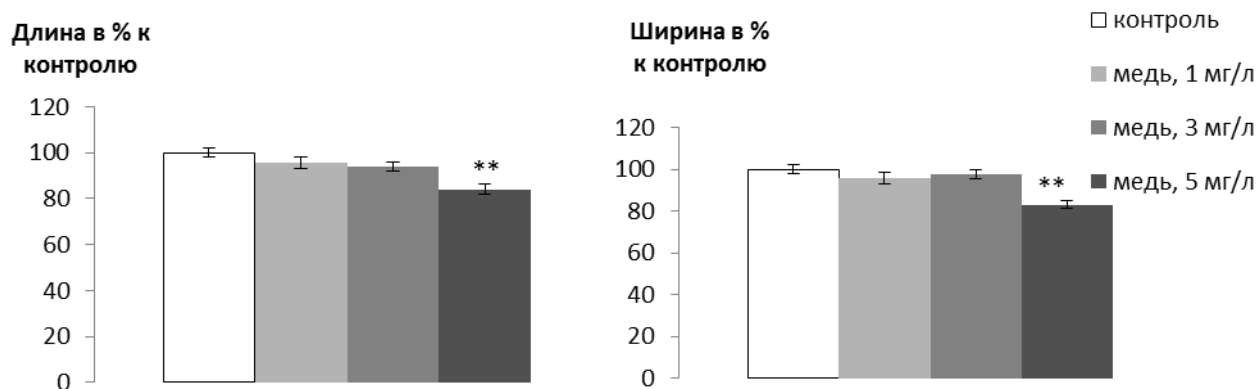


Рисунок 3.7 – Влияние меди на длину и ширину листецов ряски крошечной. Представлены средние значения и их стандартные ошибки ($n=20$). Знаком ** отмечены значимые различия с контролем

Медь в количестве 1 и 3 мг в 1 литре питательной среды значимо не повлияла ни на длину ($p=0,074$, $Q=3,158$ – 3 мг/л), ни на ширину листецов ($p=0,730$, $Q=1,072$). При концентрации 5 мг/л было отмечено значимое уменьшение размеров листецов: на 16 % длины ($p=0,001$, $Q=11,35$) и на 17 % ширины по сравнению с контролем ($p<0,001$, $Q=7,148$).

Результаты по влиянию Cd^{2+} представлены на рисунке 3.8.

Кадмий в концентрации 1 мг/л вызывал сокращение длины на 10 % ($p<0,001$, $F=14,67$) и ширины на 16 % ($p<0,001$, $F=17,62$) по сравнению с контролем.



Рисунок 3.8 – Влияние кадмия на длину и ширину листецов ряски крошечной. Представлены средние значения и их стандартные ошибки ($n=20$). Знаком ** отмечены значимые различия с контролем

Никель в концентрациях вплоть до 5 мг/л на размеры листочков не повлиял ($p=0,997$, $Q=0,285$ – для длины; $p=0,841$, $Q=1,171$ – для ширины) (рисунок 3.9). При концентрации 8 мг/л выявлено снижение длины на 13 % ($p=0,007$, $Q=4,693$), ширины на 17 % ($p<0,001$, $Q=10,86$). В среде с 10 мг Ni^{2+} в 1 литре сформировавшиеся листочки имели длину на 33 % ($p<0,001$, $Q=13,25$) и ширину на 28 % ($p<0,001$, $Q=16,22$) меньше, чем контрольные растения.

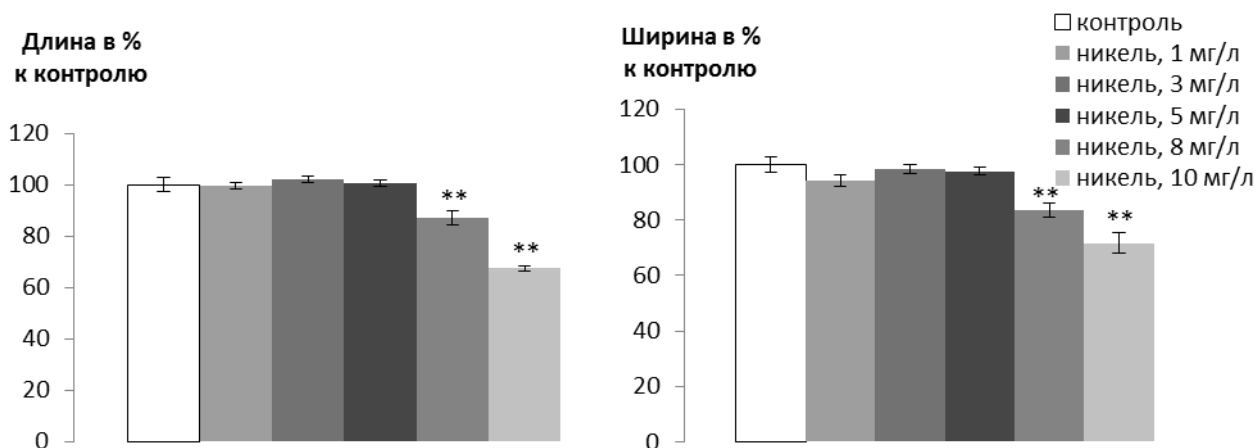


Рисунок 3.9 – Влияние никеля на длину и ширину листочков ряски крошечной. Представлены средние значения и их стандартные ошибки ($n=20$). Знаком ** отмечены значимые различия с контролем

Следовательно, можно заключить, что кадмий в концентрации 1 мг/л не только вызвал снижение скорости вегетативного размножения ряски крошечной, но и повлиял на деление и расхождение клеток, что проявилось в уменьшении линейных размеров листочков. Однако не было обнаружено деформаций, нарушения типичной эллиптической формы листочков. Медь действовала на растения аналогично, но эффект был отмечен при бóльшей концентрации – 5 мг/л. Действие никеля показало, что, во-первых, этот металл менее токсичен для ряски крошечной, чем кадмий и медь, во-вторых, молодые, растущие листочки чувствительнее к этому металлу, чем взрослые, материнские. При этом дочерние листочки неоднородны по реакциям на никель: клетки, расположенные у основания листочка, чувствительнее, чем вегетативные, образующие дистальный отдел. Это выразилось в существенном нарушении формы растущих листочков, что было отмечено ранее. Действие меди, никеля и кадмия, таким образом, проявляется и на уровне

отдельных особей ряски крошечной – листецов, и на уровне всей популяции в целом.

3.4. Зависимости между степенью токсичности металлов для ряски крошечной и их физико-химическими свойствами

Для объяснения и предсказания токсических действий металлов используется несколько шкал, в основу которых положены разные физико-химические свойства металлов. Наиболее широко используемые шкалы описаны в работах [149-153]. Например, токсическое действие металлов связывают с жёсткостью, мягкостью, сродством к мягким и жёстким лигандам, стандартным электродным потенциалом, первым потенциалом ионизации, электроотрицательностью, зарядом иона, плотностью металла и т. д.

В соответствии с теорией Пирсона жёсткими называются ионы, обладающие устойчивым электронным облаком, слабо деформирующемся во внешнем электрическом поле, слабо поляризующиеся, будучи химически связанными. Жёсткие ионы, как правило, образуют ионные связи. Мягкие ионы обладают противоположными свойствами: их электронные облака легко деформируются, сами ионы поляризуются в бóльшей степени в химических связях и образуют ковалентные связи. Жёсткие металлические ионы образуют более прочные связи с жёсткими лигандами, мягкие металлические ионы образуют прочные связи с мягкими лигандами.

Мягкие лиганды обладают высокой поляризуемостью, низкой электроотрицательностью, большими радиусами, незаполненными орбиталями низких энергий, легко окисляются. Жёсткие лиганды имеют противоположные свойства. В биологических системах жёсткие лиганды часто содержат кислород и азот ($R-COO^-$, $R-PO_4^-$, $R-NH_2$ или R_2-NH), в то время как мягкие – серу ($R-S^-$ или R_2-S).

К жёстким металлическим ионам относят: Al^{3+} , Be^{2+} , Ca^{2+} , Ce^{3+} , Co^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Ga^{3+} , H^+ , In^{3+} , K^+ , La^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Sc^{3+} , Sn^{4+} , Ti^{4+} , U^{4+} и Zr^{4+} . Мягкие: Ag^+ , Au^+ , Cd^{2+} , Cu^+ , Hg^+ , Hg^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+} , Tl^+ и Tl^{3+} . Также выделяют переходную группу ионов или пограничную: Bi^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ir^{3+} , Ni^{2+} ,

Pb^{2+} , Ru^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} . Как правило, наиболее токсичными являются мягкие ионы.

Кинрэйд (Т. В. Kinraide) [150-151] предлагает шкалы мягкости и токсичности металлов, которые основаны стандартном электродном потенциале, первом потенциале ионизации, плотности металла и заряде иона. Взяв за основу данные, приведённые в работах [150-151, 153], мы предприняли попытку выявить зависимости между степенью токсичности исследованных металлов для ряски крошечной и их физико-химическими свойствами. Результаты представлены на рисунке 3.10.

Значимая зависимость была выявлена лишь в отношении ионного радиуса и индекса жесткости. Очевидно, из-за малого количества исследуемых металлов.

Из приведенных данных следует, что степень токсичности рассматриваемых металлов возрастает с увеличением радиуса иона и радиуса его гидратной оболочки (рис. 3.10, *а, б*). Действительно, чем больше размеры заряженной частицы, тем слабее её связь с молекулами воды, которые к ней притягиваются. Транспорт же ионов внутрь клеток сопровождается замещением воды гидратной оболочки на полярные группы, выстилающие полость трансмембранного канала переносчика [154]. Поэтому скорость транспорта крупного иона кадмия в клетки должна быть выше, чем в случае с медью и никелем. Однако само проникновение иона в клетку ещё не вызывает нарушения в её физиологии. Ион металла должен провзаимодействовать с компонентами клетки. Зависимость токсичности от жёсткости и мягкости кадмия, меди и никеля свидетельствует о том, что именно способность взаимодействовать с мягкими клеточными лигандами (серосодержащими) вносит наибольший вклад в развитие патологических процессов. Вероятно, кадмий образует более прочные комплексы с сульфгидрильными группами белков, чем медь и никель, что и приводит к потере белками своих нативных свойств.

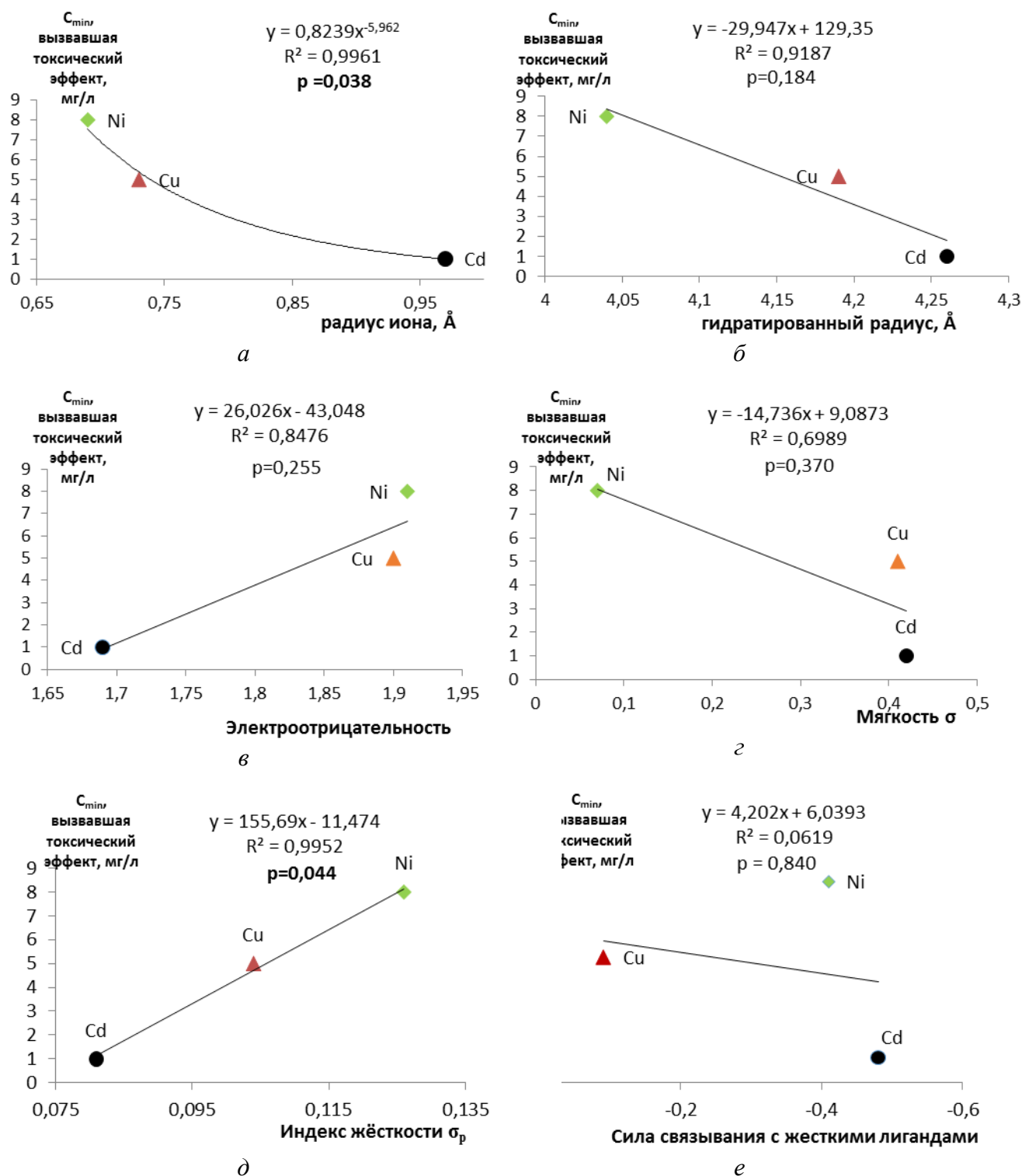


Рисунок 3.10 – Зависимости между физико-химическими свойствами кадмия, меди и никеля и их токсичностью для ряски крошечной. Мягкость σ (г) – усредненная величина, полученная автором [150] на основе нескольких шкал мягкости. Индекс жесткости σ_p (д): (энергия координатной связи фторида металла – энергия координатной связи йодида металла) / энергия координатной связи фторида металла [153]

ВЫВОДЫ

Показано, что большей токсичностью для ряски крошечной обладает кадмий: он вызывает снижение скорости вегетативного размножения на 24 % по сравнению с контролем уже в концентрации 1 мг/л. Кроме этого, кадмий приводит к уменьшению длины и ширины листецов на 10 и 16 % соответственно. Медь снизила интенсивность роста на 63 % в концентрации 5 мг/л, а также длину и ширину листецов на 16 и 17 % соответственно. Никель показал наименьшую токсичность: влияние на размножение популяции ряски, а также морфологию листецов было отмечено при 8 мг металла в 1 литре среды. У листецов, растущих на такой среде с никелем, наблюдались деформации – образование характерных зон некроза в средней части и у основания.

Установлено, что никель в концентрациях 8 и 10 мг/л не только снижает скорость вегетативного размножения *L. perpusilla*, но и вызывает значительное сокращение суммарной площади популяции листецов.

Токсическое действие изученных металлов зависит от размеров их ионов, электроотрицательности и от способности взаимодействовать с веществами клеток, содержащими мягкие лиганды, прежде всего серу.

ГЛАВА 4. ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛОКАЛИЗАЦИИ МЕТАЛЛОВ В ЛИСТЕЦАХ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ

К настоящему времени динамики поглощения различных тяжелых металлов разными представителями семейства рясковых изучены достаточно полно [10-12, 36]. Вместе с тем детали накопления ионов тяжелых металлов листецами разных возрастов остаются слабо изученными. Полученные на первом этапе исследований результаты, свидетельствующие о разной чувствительности листецов разного возраста к металлам, побудили к исследованию особенностей накопления никеля, меди и кадмия тканями листецов гистохимическими методами. Данные методы наглядно показывают динамику накопления металлов растением.

4.1. Подбор реагента для гистохимического выявления меди в растительных тканях

Для гистохимического обнаружения меди в биологических объектах применяют различные реагенты и методы: родамин, рубеоновая кислота, орсеин, метод Тиммса с серой [155-157]. Так же для этого применяют и дитизоновый реагент [110, 113-114]. Однако первые используются для исследования распределения меди в тканях человека и животных, на постоянных препаратах. Дитизоновый реагент обладает способностью выявлять медь в растительных тканях [114], но эта реакция является побочной, как отмечают авторы данного метода, дитизон лучше взаимодействует со свинцом и кадмием [110]. Кроме этого, в соответствии с методикой, дитизон в смеси ацетон:вода не подлежит хранению, использовать его необходимо в течение нескольких часов. Поэтому нами была предпринята попытка предложить реагент на основе диэтилдитиокарбамата натрия для селективного обнаружения меди в тканях органах рясок.

Известно, что диэтилдитиокарбаматы используют в лабораторной практике для количественного обнаружения меди в питьевых, природных и сточных водах [158-159]. Также известно, что разбавленные растворы диэтилдитиокарбаматов устойчивы в растворах Na_2CO_3 , аммиака,

пирофосфата [160]. Поэтому за основу был взят раствор, используемый в [158] с процентным содержанием карбамата натрия 0,1, но приготовленный на основе 1,5 %-го раствора карбоната натрия. Также исследовались растворы с массовой долей диэтилдитиокарбамата натрия 0,5 % и 1 % в 1,5 % растворе карбоната натрия и 1,5 % гидроксида натрия.

Было установлено, что минимального количество карбамата – 0,1 % – достаточно для обнаружения меди в тканях листецов ряски: при обработке растений, выдержанных в растворах меди, полученным реагентом наблюдалось характерное желтое окрашивание (рисунок 4.1). Сравнение с дитизоновым реактивом показало, что карбаматный раствор лучше выявляет медь в листецах, кроме этого, он подлежит длительному хранению (2-3 недели) [161].

Таким образом, для выявления меди нами использовался раствор диэтилдитиокарбамата натрия: в 1,5 % растворе карбоната натрия растворяли навеску диэтилдитиокарбамата до массовой доли 0,1 %. Раствор перемешивали, фильтровали. Хранили в течение 2-3 недель, в склянке из темного стекла. Цвет комплекса с медью – жёлтый.

4.2. Локализация ионов меди в листецах ряски крошечной и их реакции на металл

Изучение распределения меди в тканях ряски проводилось в растворе с концентрацией катиона меди 0,1 мг/л и 1 мг/л (ПДК меди для вод рыбохозяйственного назначения и питьевой воды соответственно) [162].

Различимое окрашивание зоны корневого кармашка наблюдалось после 6 часов пребывания листецов ряски в растворе с концентрацией металла 0,1 мг/л. (рисунок 4.2, *а*. Здесь и далее в подписях к рисункам указаны концентрации металла в растворе и время выдержки растений). При концентрации 1 мг/л окраска была отмечена уже после 15 минут нахождения растений в растворе (рисунок 4.2, *б*). Металл выявлялся в клетках корня и краевых областей (рисунок 4.2, *в*).

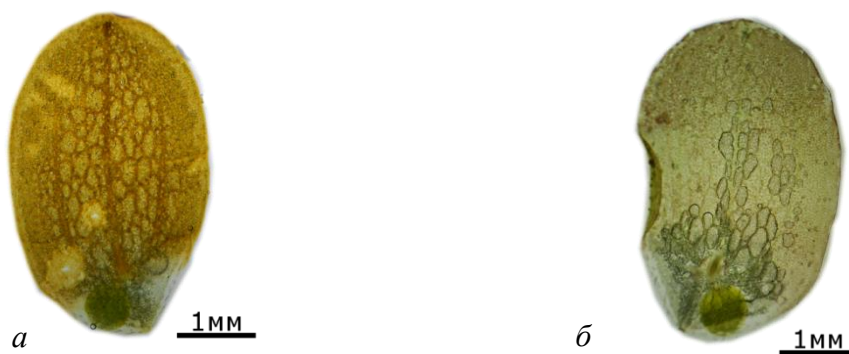
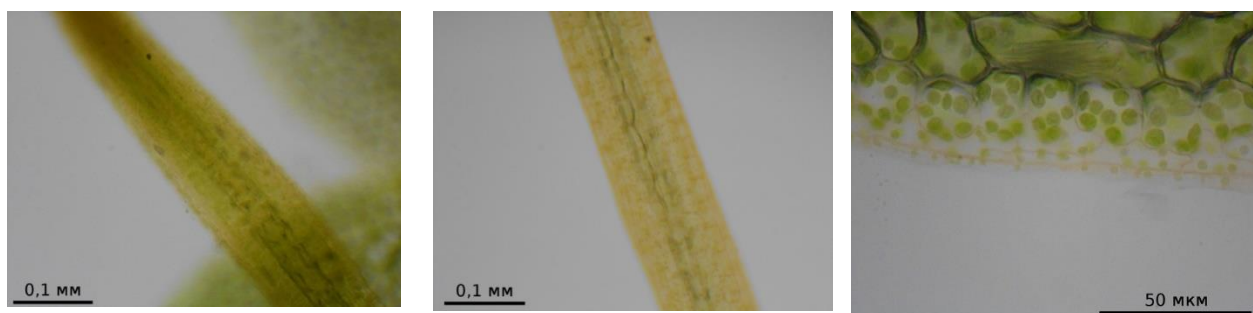


Рисунок 4.1 – Внешний вид листочков ряски крошечной, находившихся 1 сутки в растворе меди с концентрацией металла 1 мг/л: *а* – окрашивание раствором диэтилдитиокарбамата натрия; *б* – окрашивание дитизоном



а) корневой кармашек, $C_{Cu^{2+}} = 0,1$ мг/л, 6 часов
б) корень, $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л, 15 минут
в) край листеца, $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л, 15 минут

Рисунок 4.2 – Локализация меди в листеце ряски после пребывания в растворе металла [163]

В растворе, где концентрация меди составляла 1 мг/л, уже спустя час было отмечено характерное распределение окрашивания и, следовательно, распределение металла в дочерних листецах: жёлтая-зеленая дистальная часть листеца и зелёная проксимальная (рисунок 4.3, *а* и *б*) [163].



а) дочерний листец, 1 час
б) материнский листец, 1 час
в) отделительная зона дочернего листеца, 2 часа

Рисунок 4.3 – Локализация меди в листецах ряски после пребывания в растворе металла, $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л [163]

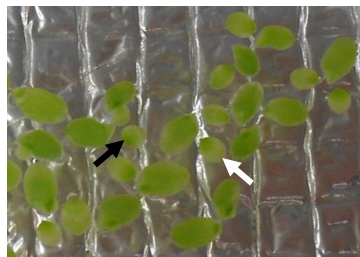
Основная часть материнских листецов, от узла до дистального края, окрашивались более равномерно, при этом было заметно интенсивное накопление металла в корнях, зонах почечных кармашков и черешков

Через 2 часа с начала наблюдений в растворе с бóльшей концентрацией металла отмечалась частичная диссоциация групп, разъединение листецов. Вероятно, это связано с накоплением металла в отдельительной зоне черешков дочерних листецов, о чём говорит окрашивание в этих участках (рисунок 4.3, *в*).

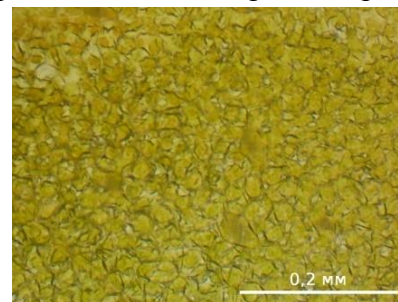
Группы после 6 часов пребывания в растворе меди с концентрацией ионов 1 мг/л практически полностью диссоциировали. Наблюдалось различное распределение зон хлороза у листецов разного возраста: у дочерних листецов становилась белой дистальная часть, в то время как проксимальная оставалась зелёной. В материнских листецах разрушение пигментов происходило более равномерно. Интересно, что зоны хлороза и зоны окрашивания реагентом у листецов, в целом, совпадали (рисунок 4.4, *а* и *б*).

В растворе меди с концентрацией 0,1 мг/л была отмечена практически полное разъединение листецов после 24 часов. Характер распределения зон хлороза листецов несколько отличался от такового в случае с листецами, находившимися в растворе с бóльшей концентрацией металла: у крупных дочерних листецов теряла окраску центральная часть, зелёными оставались проксимальная часть и узкий край дистальной. У мелких дочерних листецов хлороз происходил так же, как и дочерних листецов, находившихся в более концентрированном растворе. Материнские листецы обесцвечивались либо равномерно, либо хлороз у них происходил в случайном порядке (рис. 4.5, *а*).

Однако окрашивание таких растений не выявило значительного количества металла; окрашивались преимущественно корни (рис. 4.5, *б* и *в*). В растворе меди с концентрацией металла 1 мг/л листецы сохранили отмеченную ранее тенденцию к распределению зон хлороза и окрашивания: у дочерних листецов теряли пигментацию дистальные части, они же окрашивались реагентом.

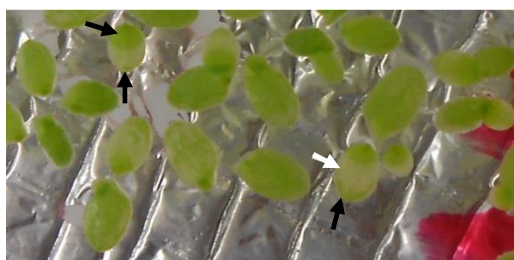


а) общий вид дочерних и материнских листочков ряски. Заметно характерное распределение зон хлороза: у дочерних листочков становилась белой дистальная часть (указана белой стрелкой), в то время как проксимальная оставалась зелёной (указана чёрной стрелкой). В материнских листочках разрушение пигментов происходило более равномерно.



б) дочерний листец в) материнский листец г) поверхность листочка, заметно окрашивание вегетативных клеток

Рисунок 4.4 – Локализация меди в листочках ряски после пребывания в растворе металла, $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л, 6 часов [163]



а) общий вид дочерних и материнских листочков ряски, $C_{Cu^{2+}} = 0,1$ мг/л, Заметно распределение зон хлороза: у крупных дочерних листочков становилась белой центральная часть (указана белой стрелкой), в то время как проксимальная и край дистальной части оставались зелёными (указаны чёрными стрелками). В материнских листочках разрушение пигментов происходило либо равномерно, либо случайным образом.

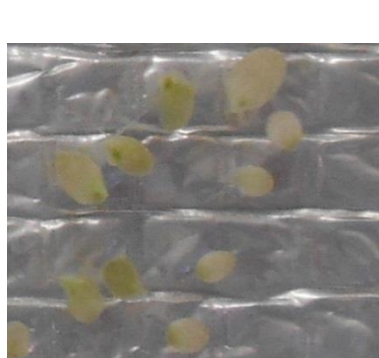


б) дочерний листец, $C_{Cu^{2+}} = 0,1$ мг/л в) материнский листец, $C_{Cu^{2+}} = 0,1$ мг/л г) дочерний листец, $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л д) материнский листец, $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л

Рисунок 4.5 – Локализация меди в листочках ряски после пребывания в растворах металла в течение 1 суток

Материнские листецы обесцвечивались равномерно и, в целом, также равномерно окрашивались диэтилдитиокарбаматом натрия (рисунок 4.5, *з* и *д*).

В процессе наблюдений в течение оставшихся 6 суток отмечались развитие хлороза, потеря тургорного давления листецами, почти полная диссоциация групп ряски в растворе меди 0,1 мг/л. Также усиливалась и интенсивность окраски обрабатываемых листецов. При этом интересно отметить, что даже после 7 суток нахождения в растворе меди с концентрацией 1 мг/л дочерние листецы и почки сохраняли зону узла зелёной. Небольшие асимметричные материнские листецы оставались бледно-зелёными, а крупные симметричные – лишались зелёной окраски (рисунок 4.6, *а*) [163].



а) общий вид листецов,
 $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л



б) дочерний листец,
 $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л.

Окрашивание
дистальной части и
отделительной зоны



в) материнский листец,
 $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л. Окрашена

основная часть листеца от
узла до дистального края,
черешок, заметна зеленая
почка



з) материнский листец, $C_{Cu^{2+}} = 0,1$ мг/л



д) материнский листец, $C_{Cu^{2+}} = 0,1$ мг/л

Рисунок 4.6 – Локализация меди в листецах ряски после пребывания в растворах металла на 7-е сутки [163]

4.3. Локализация ионов никеля и кадмия в листецах крошечной и их реакции на металлы

Исследования распределения никеля и кадмия в тканях листецов ряски были проведены с помощью растворов диметилглиоксима и дитизона, методика эксперимента была аналогичной, что применялась в случае с медью. Никель выявлялся в зоне корневого кармашка спустя 15 минут нахождения в растворе никеля, 1 мг/л. В 10-тикратно разбавленном растворе слабое окрашивание в тех же структурах листецов были отмечены лишь спустя сутки выдержки (рисунок 4.7).

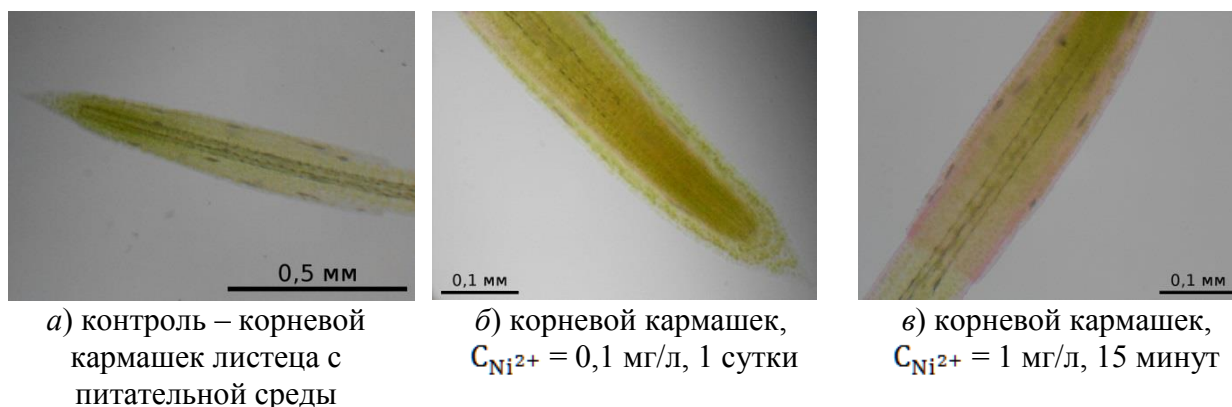


Рисунок 4.7 – Локализация никеля в листецах ряски после пребывания в растворах металла

Характерное для комплекса дитизона с кадмием интенсивное окрашивание корней листецов наблюдалось у растений из концентрированного раствора кадмия уже после 15 минут. Схожее по интенсивности окрашивание корней листецов в разбавленном растворе отмечалось через 2 часа с момента пересадки растений (рисунок 4.8). Кадмий выявлялся в клеточных стенках корней.

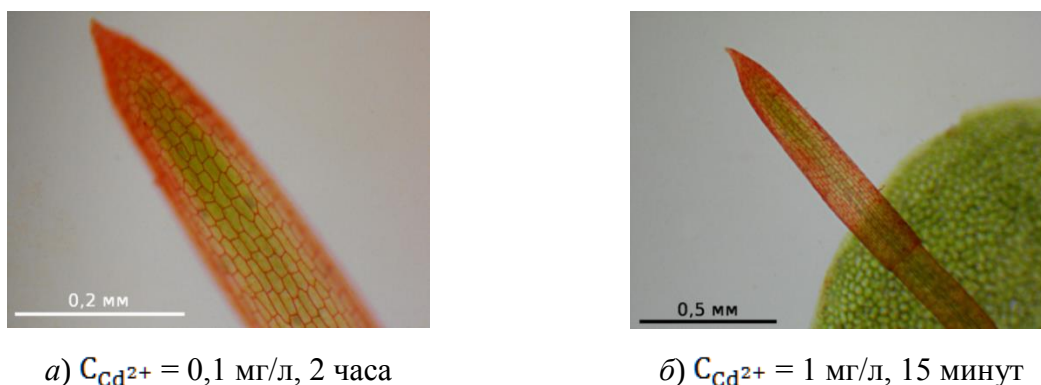


Рисунок 4.8 – Локализация кадмия в корневых кармашках листецов ряски после пребывания в растворах металла. Интенсивно окрашены клеточные стенки

Отмеченные в варианте с медью диссоциации групп, снижение тургора и развитие хлороза/некроза наблюдались и в случаях с никелем и кадмием. Различия заключались в том, что в растворе никеля, 0,1 мг/л, у части дочерних листочков хлороз развивался в центральной части, от узла. Материнские листочки в концентрированном растворе никеля и растворах кадмия теряли зелёную окраску равномерно по всей поверхности. У дочерних листочков в таких растворах хлорозу вначале подвергался дистальный край. Интенсивность развития хлороза у растений в растворах никеля и кадмия была ниже, чем в растворах меди.

После 7 суток в растворе никеля с концентрацией 0,1 мг/л у материнских листочков, обработанных диметилглиоксимом, окрашивались корни, отделительные зоны. У взрослых листочков из концентрированного раствора никеля окрашивались не только корни, черешки, но и вегетативные ткани. У дочерних некоторое количество металла выявлялось в проксимальной части, корешке (рисунок 4.9).

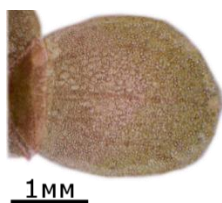
Обработка дитизоновым реактивом листочков после 7 суток пребывания в растворе кадмия, 0,1 мг/л, показала, что материнские листочки интенсивно накапливают металл практически по всей площади, а также в корнях. В концентрированном растворе наиболее интенсивное окрашивание отмечалось на 5 сутки. К 7 суткам интенсивность окрашивания снижалась, видимо, из-за разрушения клеток и десорбции металла обратно в раствор. В разбавленном растворе кадмия максимум окрашивания наблюдался именно на 7 сутки (рисунок 4.10). Результаты проведенных гистохимических исследований свидетельствуют о том, что сорбция металлов листочками происходит уже в течение первых часов и активно идет на корнях. Хотя, как было отмечено выше, корни у рясовых практически не выполняют функций всасывания и транспорта веществ, их погруженность и, по всей вероятности, особый состав клеточных стенок обеспечивают быстрое извлечение металлов из среды и их накопление [164-167].



а) общий вид листецов, $C_{Ni^{2+}} = 0,1$ мг/л



б) общий вид листецов, $C_{Ni^{2+}} = 1$ мг/л



в) дочерний листец, $C_{Ni^{2+}} = 1$ мг/л



г) аэренхима материнского листеца, $C_{Ni^{2+}} = 1$ мг/л

Рисунок 4.9 – Локализация никеля в листецах ряски после пребывания в течение 7 суток в растворах металла



а) $C_{Cd^{2+}} = 1$ мг/л, 5 сутки



б) $C_{Cd^{2+}} = 1$ мг/л, 7 сутки



в) $C_{Cd^{2+}} = 0,1$ мг/л, 7 сутки

Рисунок 4.10 – Локализация кадмия в листецах ряски после пребывания в растворах металла

По мере проникновения металлов в клетки самих листецов развиваются и усиливаются патологические процессы, хорошо известные в литературе [9]: окислительный стресс, увеличение проницаемости мембран, нарушения в

работе ферментов, деградация фотосинтетических пигментов. В вариантах с никелем, медью и раствором кадмия 0,1 мг/л интенсивность окраски препаратов не снижалась в течение наблюдений. У листецов из концентрированного раствора кадмия максимум окрашивания был отмечен на 5 сутки, после чего, к концу эксперимента, металл выявлялся, в основном, в корнях. По всей видимости, кадмий, как более токсичный металл, вызвал нарушения в клетках, их разрушение, в силу чего произошла десорбция кадмия обратно в раствор. Также можно предположить, что кадмий прочнее связывается именно с клеточными стенками корней. Действительно, авторы Кван и Смит (K.H.M. Kwan, S. Smith) [168] показали, что после поглощения ионов кадмия растениями *L. minor* более 60 % металла находятся в клетках в водорастворимых формах; связан он преимущественно с пектинами и белками клеточных стенок.

Листецы разного возраста по-разному окрашивались реагентами, развитие хлорозов/некрозов у них также происходило на разных участках в присутствии разных токсикантов. Подобные реакции рясковых на соли тяжелых металлов описаны в литературе [169]. Например, известно, что у ряски малой, тройчатой и вольфии бескорневой под действием меди происходит диссоциация групп, обесцвечивание материнских листецов, зелёную окраску сохраняют лишь почки. Кобальт вызывает у многокоренника и *L. minor* некроз по краям листецов, потерю тургора, разъединение листецов. По всей видимости, разные листецы, слагающие группы листецов рясковых, обладают разной чувствительностью и устойчивостью к разным тяжелым металлам. По отношению к меди и кадмию материнские листецы *L. perpusilla* оказываются более чувствительными, чем дочерние. Наоборот, никель является более токсичным для дочерних, чем для материнских листецов. Следует отметить, что результаты гистохимического анализа согласуются с экспериментами по влиянию металлов на скорость размножения и морфологию листецов.

4.4. Определение тяжелых металлов в водных средах с использованием гистохимических методов

Нами проведены исследования по обнаружению ряда тяжелых металлов (никель, кадмий, свинец, медь) в природном водоёме с помощью ряски и гистохимических методов. В данном случае ряска была выбрана 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 ($+ 51^{\circ} 28' 9.96''$ с. ш., $+46^{\circ} 5' 33,76''$ в. д.) 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), 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 листочков не наблюдалось, но было отмечено интенсивное окрашивание корней после воздействия на ряску раствора дитизона (рисунок 4.11) [161].



Рисунок 4.11 – Корни природной ряски, обработанной растворами: а) – дитизона; б) – диметилглиоксима; в) – диэтилдитиокарбамата натрия [161]

Таким образом, простые гистохимические методы могут быть использованы для совершенствования биоиндикационных способов оценки состояния природных пресных вод.

ВЫВОДЫ

Гистохимическими методами исследования была выявлена локализация тяжелых металлов (меди, никеля и кадмия) в тканях ряски *L. perpusilla* при времени выдержки растений в солевых растворах ($C=0,1$ и 1 мг/л) от 15 минут до 7 суток. Сорбция металлов начинается уже в первые минуты пребывания растения в растворах, активно идет на поверхности корней. Установлено, что листецы разного возраста по-разному накапливают металлы: медь и кадмий активнее поглощаются вегетативной зоной дочерних листецов, чем меристематической; материнские листецы равномерно накапливают медь, никель и кадмий. Никель накапливается интенсивнее у дочерних листецов в проксимальной части.

Интенсивность окрашивания листецов во всех растворах, за исключением кадмия, $C = 1$ мг/л, не снижалась в течение наблюдений. В концентрированном растворе кадмия к 7 суткам, судя по характеру окрашивания, произошла десорбция металла обратно в раствор.

Предложен карбаматный раствор для выявления ионов меди в растительных тканях.

Гистохимические методы могут быть использованы для совершенствования биоиндикационных способов оценки состояния природных пресных вод.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ЛИСТЕЦОВ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ

В обзоре литературы отмечалась значительная роль биоэлектрических потенциалов в жизнедеятельности растительных организмов. Транспорт катионов металлов, а также анионов кислотных остатков из модельных растворов и сточных вод в процессе фиторемедиации должен сопровождаться изменением электрических свойств растений. В этой связи нами были проведены эксперименты по изучению динамики поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в сульфатных, хлоридных, ацетатных и нитратных растворах меди с концентрацией ионов металла 10 мг/л (0,16 мкМ). Такому количеству меди соответствуют следующие концентрации анионов: Cl^- – 11,18 мг/л (0,31 мкМ); SO_4^{2-} – 15,12 мг/л (0,16 мкМ); NO_3^- – 19,53 мг/л (0,32 мкМ); CH_3COO^- – 18,58 мг/л (0,16 мкМ). Такие концентрации Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- меньше, чем ПДК для природных вод [170]: 300, 500 и 45 мг/л соответственной. Лишь в случае с ацетат-анионом в растворе его концентрация многократно превышала ПДК – 0,4 мг/л [171].

5.1. Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в растворах меди с разным анионным составом

Статистический анализ результатов измерений поверхностных потенциалов ряски в разных растворах меди показал отсутствие значимых различий по величинам потенциалов в нитратных и сульфатных, а также ацетатных и хлоридных растворах. Значимые отличия ($p < 0,05$) между потенциалами были отмечены по истечении 20, 30 минут – нитратном и ацетатном, сульфатном и ацетатном растворах и через 3 и 3,5 часа от начала эксперимента в сульфатном и хлоридном и нитратном и хлоридном, растворах (рисунок 5.1). При этом потенциалы растений в ацетатном и хлоридном растворах были выше, чем в сульфатных и нитратных растворах меди на ~ 80 мВ (через 30 минут) и ~ 70÷76 мВ (через 3 – 3,5 часа). В остальные моменты фиксации потенциалы листецов в разных по анионному составу растворах не отличались между собой. Самые главные различия –

различия с контролем (потенциалом в дистиллированной воде) были зафиксированы через 20-30 минут в ацетатном и через 2-2,5 часа в сульфатном и нитратном растворах, а также через 4,5-6 часов в хлоридном и ацетатном. По всей видимости, изменения поверхностных потенциалов в первые 1,5 часа незначительно отражают сорбционные процессы, происходящие в клетках листецов.

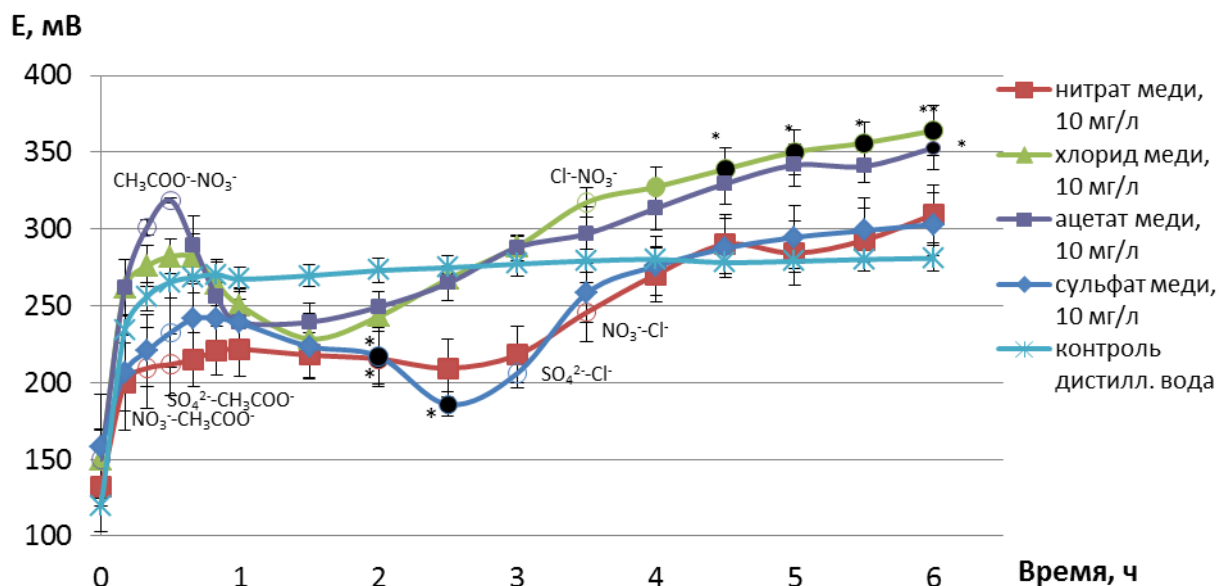


Рисунок 5.1 – Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в солевых растворах меди, $C_{Cu^{2+}}=10$ мг/л. Знаком О отмечены значимые различия между опытными вариантами, ● – различия между контролем и опытным вариантом; * – различия, значимые при $p<0,05$, ** – при $p<0,01$ от контроля. Представлены средние значения и их стандартные ошибки (n от 3 до 6)

Поверхностные потенциалы листецов в ацетатном и хлоридных растворах в течение первых 30 минут поглощения достигали максимальных значений $\sim 280 \div 320$ мВ, после чего достаточно резко снижались до ~ 220 мВ в течение последующего часа. Впоследствии происходило плавное возрастание потенциала до ~ 350 мВ к 6-му часу наблюдений [172].

Динамика начальных значений потенциалов растений ряски в сульфатных и нитратных растворах меди несколько отличалась от изменений в ацетатном и хлоридном растворах. Потенциал возрастал до $\sim 220 \div 250$ мВ к 40 - 50 минутам наблюдений, затем несколько снижался в течение 2 часов, принимая минимальное значение ~ 200 мВ. Далее также отмечалось

повышение величин E , аналогично тому, как и в ацетатном и хлоридном растворах.

Относительно быстрое поглощение меди вызывает изменение концентрации металла в непосредственной близости от листецов; при этом вполне возможно, происходит и обратный процесс - перенос некоторого количества ионов меди обратно в раствор. Такой процесс может протекать как пассивно, лишь за счет концентрационного градиента через белки-переносчики, так и через транспортные АТФазы, работающие с использованием химической энергии АТФ [16]. Это может приводить к наблюдаемому значимому снижению потенциала растения в сульфатном и нитратном растворах по сравнению с контролем.

Дальнейшее повышение потенциала, отмеченное до конца наблюдений, вызвано, по всей вероятности, поглощением катионов меди, которая, как известно [77] принимает участие в биохимических процессах в клетках растений. Медь в высоких концентрациях оказывает токсическое действие на растения, что приводит к невозможности регулирования содержания металла в клетках.

Динамика изменения поверхностного потенциала листецов в нитратном и сульфатном растворах, как уже было сказано выше, принципиально не отличалась от ацетатного и хлоридного. Более низкие значения на 20-30 минуте, а также через 3,0 и 3,5 часа от начала наблюдений могут быть вызваны большей подвижностью сульфат - и нитрат-анионов по сравнению с катионами меди [173]. Более подвижные анионы быстрее концентрируются у поверхности клеток, мешая, в некоторой степени, транспорту металла в растение. Замедленная диффузия меди, по сравнению с диффузией в ацетатном и хлоридном растворах, приводит и к меньшему концентрационному градиенту в первый час пребывания растений в сульфатном и нитратном растворах. Вероятно, именно вследствие этого, в последних случаях отмечалось меньшее по величинам, но более длительное снижение поверхностных потенциалов растения. Следует отметить, что к 6-

му часу наблюдений лишь в хлоридных и ацетатных растворах потенциалы листецов в значимой степени отличались от контроля.

5.2. Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в ацетатных растворах меди с разной концентрацией металла

В ацетатных растворах с различной концентрацией ионов меди (рисунок 5.2) были обнаружены следующие особенности изменения потенциала. В растворе с концентрацией меди 0,1 мг/л наблюдалось повышение потенциала в течение первых 1,5 - 2,0 часов. В дальнейшем ход E, t – кривых был практически постоянным на уровне потенциала ~350 мВ. Потенциал листецов в этом растворе значимо отличался от контроля со 2-го часа до конца регистрации. В растворе с концентрацией металла 1,0 мг/л Cu^{2+} на 40 минуте отмечался пик на уровне $E=314$ мВ, после чего потенциал снижался до ~240 мВ к 1,5-2,5 часам. Затем следовало его повышение до 380 мВ к концу наблюдений (6 часов). Значимые различия с контролем были зафиксированы с 4,5 часа.

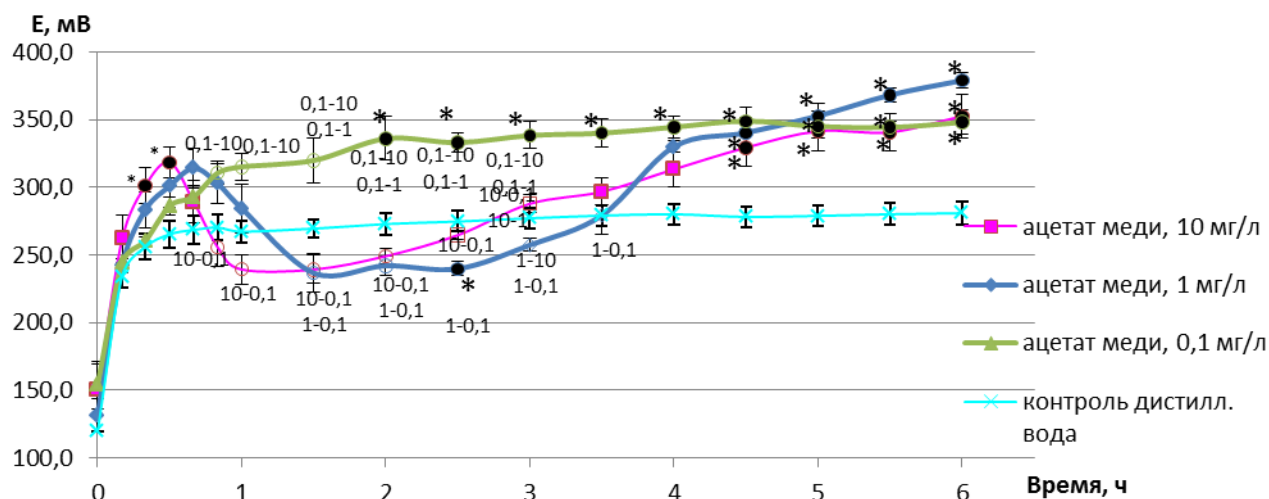


Рисунок 5.2 – Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в ацетатных растворах меди с разной концентрацией металла: 0,1, 1,0 и 10 мг/л. Знаком ○ отмечены значимые различия между опытными вариантами, ● – различия между контролем и опытным вариантом; * – различия, значимые при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$ от контроля. Представлены средние значения и их стандартные ошибки (n от 3 до 6)

В более концентрированном растворе, 10 мг/л Cu^{2+} , динамика потенциала была, в целом, подобной той, что наблюдалась в растворе с

концентрацией 1,0 мг/л, но время достижения пика ($E \sim 318$ мВ) наблюдалось ранее, при этом и последующее более резкое снижение потенциала происходило быстрее, завершаясь уже к первому часу фиксации. Также следует отметить, что и восстановление потенциала происходило быстрее, чем в 10-кратно разбавленном растворе. Значимые различия с контролем были зафиксированы начиная с 4,5 часа. Величины поверхностного потенциала листецов в растворе 1,0 мг/л было значимо меньше в течение $\sim 3,5$ часов, чем в концентрированном растворе.

Достоверные различия значений потенциалов были выявлены начиная с 50 минут и до 3,5 часов измерений: в этот период потенциалы листецов, находившихся в растворе меди, 0,1 мг/л, были выше, чем в более концентрированных растворах. С 3,5-4-й по 6-й часы измерений поверхностные потенциалы листецов ряски, пребывавших в ацетатных растворах меди, не имели значимых различий.

Описанная динамика потенциалов в ацетатных растворах может быть связана, в случаях с $C_{Cu^{2+}} = 1$ мг/л и 10 мг/л, с формированием концентрационных градиентов у поверхности листецов: повышение потенциалов в первые 30 - 40 минут определяется диффузией меди в растения, последующее снижение – обратным потоком металла из-за возросшей его концентрации в клетках и уменьшившейся в окружающем растворе. То есть между тканями растения и раствором в процессе сорбции происходит непрерывный катионный обмен и по истечении ~ 4 -х часов устанавливается равновесное или близкое к равновесию состояние. Известно, что ряска малая, например, извлекает ионы меди с высокой скоростью в первые 5 часов сорбции, после чего скорость поглощения металла снижается [174].

В разбавленном растворе, вероятнее всего, имеет место лишь постепенная диффузия меди в листецы, при этом значительные перепады концентраций металла отсутствуют.

5.3. Влияние УФ-излучения на динамику поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в присутствии ионов меди

Для сравнения были проведены измерения потенциалов листецов облученных УФ в течение 20 минут и необлученных.

Результаты измерений пребывания в сульфатном растворе меди ($C_{Cu} = 10$ мг/л) представлены на рисунке 5.3.

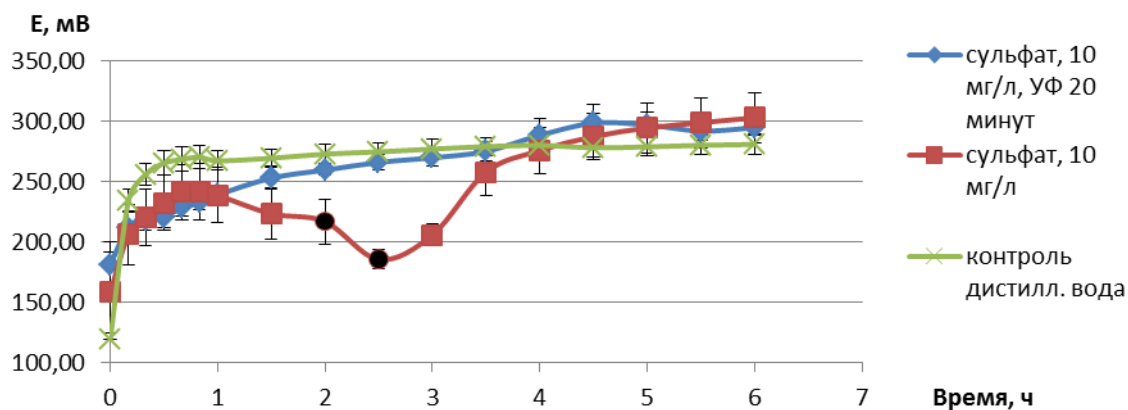


Рисунок 5.3 – Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в сульфатных растворах меди, $C_{Cu^{2+}} = 10$ мг/л, без и после воздействия УФ. Знаком ● отмечены значимые различия между контролем и опытным вариантом. Представлены средние значения и их стандартные отклонения ($n = 6$)

Динамика поверхностного потенциала листецов, подвергшихся облучению УФ, отличалась от таковой у необлученных растений на 2-3 час фиксации – отсутствовало «проседание» значений E . Во все остальные моменты ход потенциала после воздействия УФ не отличался от контроля (дистиллята), а также необлученных растений в сульфатном растворе.

Результаты измерений поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной во время пребывания в ацетатном растворе меди ($C_{Cu} = 10$ мг/л) представлены на рисунке 5.4.

Интересно отметить, что у облученных УФ листецов не было отмечено характерного пика потенциала в первые 20-30 минут регистрации: значения потенциала увеличивались до 4 часов наблюдений, практически не меняясь к концу наблюдений. Именно в первые 30 минут у облученных листецов были зарегистрированы значимые различия величин потенциалов по сравнению с контрольными растениями. В остальное время потенциалы контрольных и опытных растений не отличались.

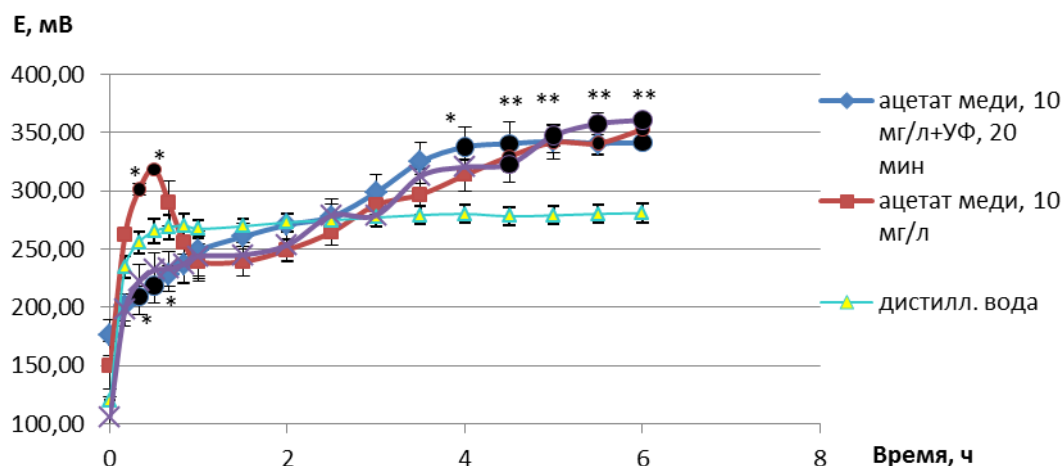


Рисунок 5.4 – Динамика поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в ацетатных растворах меди, $C_{Cu^{2+}}=10$ мг/л, без и после воздействия УФ. Знаком $\circ$ отмечены значимые различия между опытными вариантами, $\bullet$ – различия между контролем и опытным вариантом; * – различия, значимые при $p<0,05$, ** – при $p<0,01$ от контроля. Представлены средние значения и их стандартные ошибки ($n = 6$)

Описанные различия могут, на наш взгляд, свидетельствовать о том, что УФ-излучение вызывает повреждения клеток листецов, что отрицательно сказывается на их способности активно регулировать поступление меди.

ВЫВОДЫ

Динамики поверхностных потенциалов листецов ряски крошечной в сульфатных и нитратных и ацетатных и хлоридных растворах меди, $C_{Cu}=10$ мг/л, идентичны. В целом ход потенциалов характеризуется достижением некоторого максимума в течение первого часа до ~ 250 и ~ 350 мВ, после чего следует спад значений E к 1,5-2,5 часам и их плавное нарастание к 6 часу регистрации. Значения величин потенциалов относительно контроля (дистиллированной воды) были значимо ($p<0,05$) выше в ацетатном растворе через 30 минут от начала наблюдений, в ацетатном и хлоридном растворах через 4,5-6 часов. Достоверно меньшие значения ($p<0,05$) по сравнению с контролем были отмечены в сульфатном растворе на 2-2,5 часа. Облучение УФ не оказало влияния на ход поверхностного потенциала листецов в сульфатном растворе. В ацетатном растворе значения E после воздействия УФ имели отличия от контроля в первые 30 минут от начала измерений: не было отмечено характерного пика потенциала.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ И УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ И ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ

6.1. Влияния постоянного магнитного поля на рост ряски крошечной

В работах [175-177] были получены данные, показывающие влияние электрических и различных магнитных полей на размножение ряски малой *L. minor*. Установлено, что постоянное магнитное поле напряженностью 2 кА/м оказывает стимулирующее действие на вегетативное размножение ряски малой, поле напряженностью 0,5, 1 и 4 кА/м – угнетающее. Кроме этого, поле напряженностью 2 кА/м и длительностью 6 часов повышало эффективность извлечения ионов тяжелых металлов из водных растворов ряской. В связи с этим были проведены эксперименты по влиянию постоянного магнитного поля напряженностью 2 и 4 кА/м на ряску крошечную в течение 1, 3, 6 и 24 часов. Результаты представлены на рисунке 6.1 (в подписях указаны напряженность поля и время воздействия).

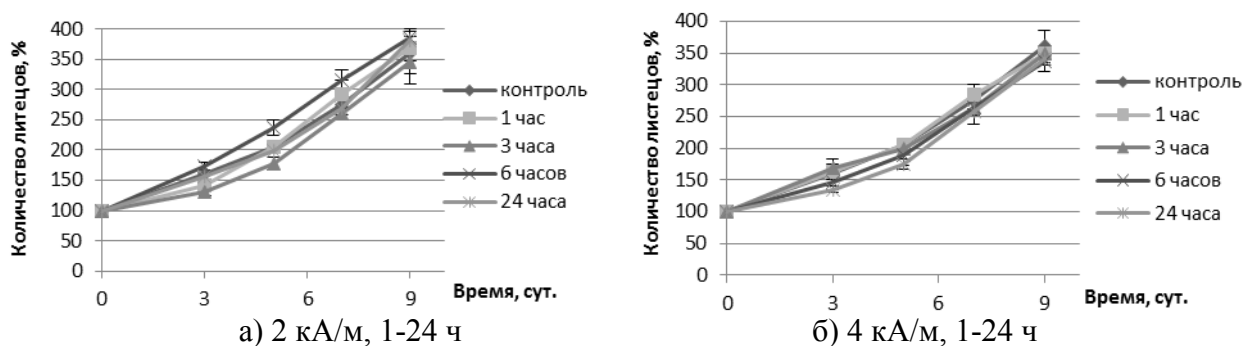


Рисунок 6.1 – Влияние ПМП различной напряженности на размножение ряски крошечной. Представлены средние значения и их стандартные отклонения

Результаты свидетельствуют о том, что магнитное поле с указанными характеристиками не оказало никакого влияния на размножение ряски крошечной. Также не было выявлено изменений во внешнем облике растений после воздействия поля.

6.2. Влияния УФ-излучения на рост ряски крошечной

Работы по изучению влияния УФ на растения в целом и ряску в частности ведутся уже несколько десятилетий [129-130, 178-183]. Было

выявлено как угнетающее действие УФ-излучения на рост и развитие растений, так и, в некоторых случаях, стимулирующее. Также было отмечено угнетающее действие ультрафиолета длиной волны $\lambda=253,7$ нм на рост ряски малой и эйхорнии, но и, вместе с тем, стимуляция извлечения тяжелых металлов, меди, в частности, облученными растениями [184]. Действие УФ-излучения в некоторых аспектах схоже с влияниями тяжелых металлов на растения: в клетках накапливаются активные формы кислорода, происходит перекисное окисление липидов [185]. Поэтому нами были проведены эксперименты по влиянию УФ-излучения с длиной волны 253,7 нм на ряску крошечную. Результаты представлены на рисунке 6.2.

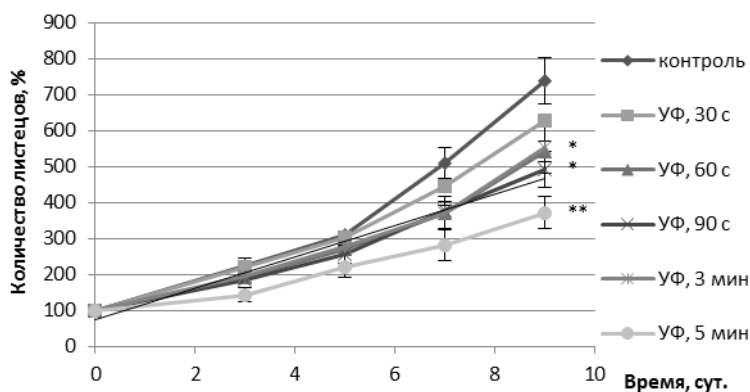


Рисунок 6.2 – Влияние УФ-излучения различной продолжительности на размножение ряски крошечной. Представлены средние значения и их стандартные отклонения ($n=3$). Знаком * отмечены различия значимые при $p<0,05$, ** – при $p<0,01$ от контроля

Установлено, что ежесуточное воздействие в течение 30 секунд на протяжении 8 суток к 9-м суткам значимо не снижало скорость вегетативного размножения ряски ($p=0,131$, $Q=3,918$). Облучение длительностью 60 и 90 секунд каждые 24 часа вызывало угнетение процесса размножения ряски к 9 суткам ($p=0,004$, $Q=6,9$ и $p<0,001$, $Q=8,654$ соответственно). Однократное воздействие УФ в течение 3 и 5 минут также негативно сказалось на репродукции растений ($p=0,006$, $Q=6,549$ и $p<0,001$, $Q=12,86$ соответственно). Кроме этого, ежесуточное воздействие УФ-излучением в течение 1 и 1,5 минут, а также однократное облучение УФ в течение 3 и 5 минут вызывало характерную деформацию листочков – сближение дистального и проксимального краёв, сворачивание в поперечном

направлении и хлороз у материнских листецов (рисунок 6.3, б). Ежесуточное облучение длительностью 30 секунд на форму листецов не повлияло, вызвав некоторое пожелтение у материнских листецов к концу наблюдений (рисунок 6.3, а).

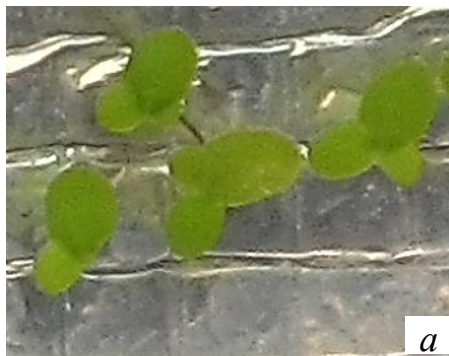


Рисунок 6.3 – Влияние УФ-излучения продолжительностью 30 – а) и 90 секунд – б) на форму листецов ряски крошечной. Деформированные дочерние листецы отмечены белыми стрелками, материнские, подверженные хлорозу, – черными

Однократное действие УФ длительностью 90 секунд на дорзальную и вентральную поверхности листецов привело к практически полной диссоциации через 24 часа после облучения, а к 9 суткам наблюдался значительный хлороз/некроз у исходных материнских листецов, зелёной оставалась область узла.

Листецы, сформировавшиеся за время эксперимента, отличались меньшими размерами по сравнению с контрольными растениями: длина была на 37 % ($p < 0,0001$, $F = 353,7$), а ширина на 41 % ($p < 0,0001$, $F = 442,8$) меньше. Также в опыте была снижена и скорость вегетативного размножения на 38 % ($p < 0,005$, $F = 57,56$). Интересно, что деформаций у растущих листецов обнаружено не было (рисунок 6.4).



Рисунок 6.4 – Внешний вид листецов на 9-е сутки после однократного действия УФ длительностью 90 секунд на дорзальную и вентральную поверхности.

Сформировавшиеся листецы отмечены белыми стрелками, материнские, подверженные хлорозу, – черными

Таким образом, можно отметить, что действие жёсткого УФ-излучения на *L. perpusilla* схоже с влиянием тяжелых металлов, которое заключается в снижении скорости размножения, развитии хлорозов/некрозов, уменьшении линейных размеров, диссоциации групп. Хотя последнее наблюдалось лишь в случае облучения растений с двух сторон, это можно объяснить более тонкими и проницаемыми вентральными стенками почечных кармашков.

Деформация молодых, растущих листецов, вероятно, связана с тем, что УФ-излучение повреждало верхнюю поверхность листеца, нарушая способность клеток делиться. Клетки нижней вентральной поверхности продолжают делиться в продольном направлении, т. к. УФ-лучи не достигают этого слоя. Это приводило к неравномерному росту листеца: более быстрый снизу и замедленный сверху, что проявлялось в искривлении, деформации (рисунок 6.5). Такая схема подтверждается результатами эксперимента по воздействию УФ на обе поверхности – в этом случае не было нарушения формы, но происходило уменьшение линейных размеров.

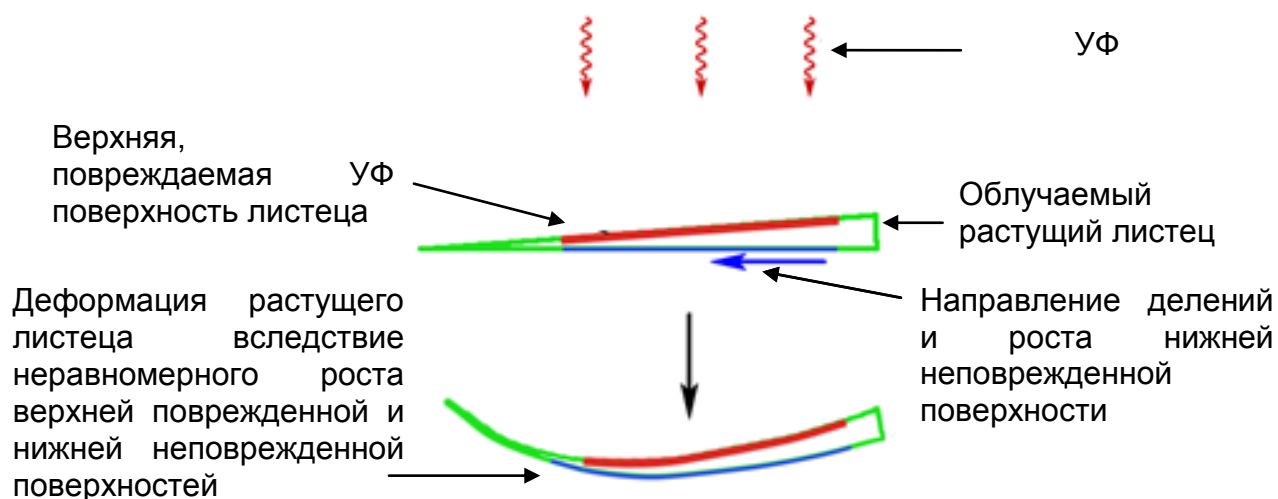


Рисунок 6.5 – Схема вероятного действия УФ-излучения на листец ряски крошечной

6.3. Влияния магнитного поля и УФ-излучения на проницаемость плазматических мембран ряски крошечной

Многие абиотические факторы среды, к которым растение эволюционно не приспособлено, могут оказывать стрессовое воздействие на организм. При этом растения испытывают явные нарушения

физиологических функций, что проявляется в изменении метаболизма и видимых дефектах. Для того чтобы оценить степень повреждения, используют разнообразные визуальные, физиологические, биохимические показатели, которые, однако, развиваются в течение долгого периода послестрессового воздействия и не вполне адекватно отражают реакцию растения на стрессовое воздействие. Одним из наиболее эффективных и быстрых методов является оценка степени повреждения клеточных мембран кондуктометрическим методом. При действии неблагоприятных факторов (низких температур, высоких концентраций тяжелых металлов) повышается утечка электролитов из тканей, свидетельствуя о нарушении избирательной проницаемости клеточных мембран. Это может быть связано с нарушением структуры мембран или состояния их липидного комплекса [186-194].

Для определения действия УФ-излучения и магнитного поля на проницаемость клеточных мембран ряски нами были проведены измерения проводимости вытяжек в соответствии с [190].

Было показано, облучение УФ в течение 5 минут привело к некоторому повышению проводимости вытяжки по сравнению с контролем, в 1,26 раза ($p=0,043$, $H=4,091$), что говорит и о небольшом повышении проницаемости клеточных мембран (рисунок 6.6, а). Воздействие магнитным полем напряженностью 2 кА/м в течение 3 часов не вызвало значимых изменений в проницаемости мембран ($p=0,500$, $H=0,454$) (рисунок 6.6, б).

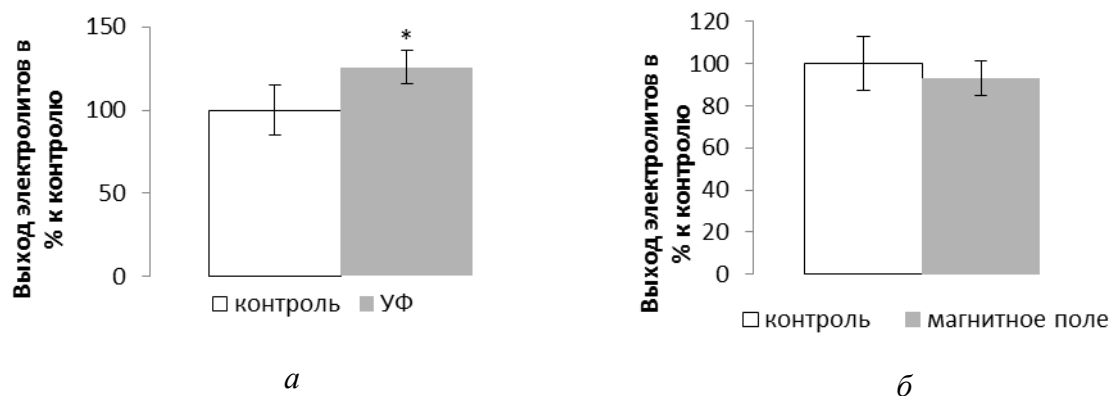


Рисунок 6.6 – Влияние УФ а) и постоянного магнитного б) поля на проницаемость мембран ряски крошечной. Представлены средние значения и их стандартные отклонения ($n=3$). Знаком * отмечены значимые различия с контролем

Такие результаты, в целом, согласуются с литературными данными. Известно, что УФ-излучение вызывает разнообразные нарушения в клетках и, в частности, перекисное окисление липидов мембран. Это приводит к нарушению целостности этих структур и повышает их проницаемость [195]. Действие магнитного поля более разнообразны, зависят от напряженности и времени воздействия. Некоторые эффекты магнитных полей плохо воспроизводятся, либо в разных лабораториях приводят к прямо противоположным результатам. Ряд исследователей полагают, что наибольшим влиянием на живые организмы обладают переменные магнитные поля. Именно такие воздействия из-за явления электромагнитной индукции вызывают возникновение ионных вихревых электрических токов в клетках, что сильно влияет на состояние организма в целом [196].

ВЫВОДЫ

УФ-излучение с длиной волны 253,7 нм длительностью 60 и 90 с ежесуточно в течение 9 суток, а также однократные воздействия в течение 3 и 5 минут снижают скорость вегетативного размножения ряски крошечной, а также вызывает хлороз и деформацию растущих листецов. Ежесуточное облучение ультрафиолетом длительностью 30 с не вызвало значимого снижения интенсивность размножения ряски, и не привело к деформации листецов. Однократное воздействие УФ в течение 90 с на дорзальную и вентральную поверхности листецов приводит к снижению скорости размножения и линейных размеров листецов, но не вызывает деформаций растений.

Установлено, что облучение ряски крошечной УФ в течение 5 минут вызвало некоторое увеличение (в 1,26 раза) проницаемости мембран по сравнению с контролем. Постоянное магнитное поле напряженностью 2 кА/м, действовавшее в течение 3 часов, на проницаемость влияния не оказало.

ГЛАВА 7. РЕГЕНЕРАЦИЯ РЯСОК ПОСЛЕ ПРЕБЫВАНИЯ В РАСТВОРАХ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ИХ СМЕСЕЙ С КАЛЬЦИЕМ

Одной из интересных и малоизученных до сих пор проблем является проблема восстановления растениями своих свойств после действия токсикантов [13]. На процессы их проникновения в растительные клетки влияют различные вещества [12, 76], которые, в свою очередь, могут ослаблять или усиливать действие поллютантов, в том числе и тяжелых металлов. Показано, например, что кальций, магний являются весьма сильными протекторами от поглощения растениями именно тяжелых металлов [76]. Описанные выше различия в реакциях ряски крошечной, находившейся в растворах солей металлов и в питательной среде с растворенными солями (быстрое накопление металлов, диссоциации групп, развитие хлорозов/некрозов в растворах), подтверждают эти данные. Очевидно, что наличие в питательной среде широкого спектра катионов и анионов существенно влияет на проникновение ионов металлов в клетки листецов и, следовательно, на развитие патологических изменений в целом растении. С другой стороны, было обнаружено, что дочерние листецы *L. perpusilla* в растворах меди, кадмия сохраняют зелёной меристематическую зону. Все это вкупе побуждает к проверке возможности восстановления, регенерации листецов после действия растворов тяжелых металлов, которые можно считать экстремальными условиями для растений.

Предварительные эксперименты показали, что листецы ряски крошечной способны к регенерации после пребывания в растворах меди с концентрацией металла 1 мг/л в течение 3 суток [163]. Кроме этого, было выявлено, что магний не оказывает защитного действия на листецы от проникновения в ткани никеля; такой способностью обладает кальций. Эти катионы были выбраны из-за их высокого содержания питательной среде Хогланда, которая использовалась в экспериментах и для выращивания культур рясок. В итоге нами была изучена возможность регенерации листецов рясок малой и крошечной после пребывания в растворах солей

никеля, кадмия и меди, а также их смесей с кальцием в течение 5 суток. Такое время было выбрано исходя из литературных данных: как правило, после 5-6 суток пребывания ряски и других макрофитов в солевых растворах тяжелых металлов, концентрации последних снижаются до некоторого минимального уровня и в дальнейшем практически не меняются (рисунок 7.1).

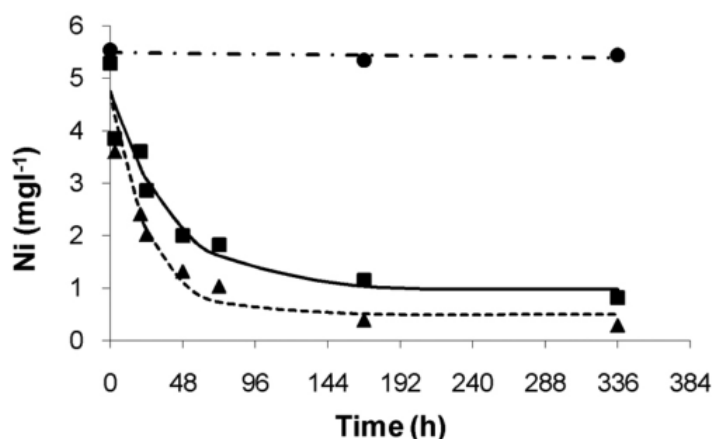


Рисунок 7.1 – Динамика концентрации никеля в присутствии ряски малой – ▲ и эйхорнии – ■. ● – контроль, раствор без растений [26]

7.1. Регенерация после растворов солей никеля и смесей никель:кальций

Регенерация ряски крошечной

В течение 5 суток пребывания листочков в растворах никеля с концентрациями 1 и 10 мг/л, а также в растворах никеля с добавлением нитрата кальция (концентрация ионов Ca^{2+} равнялась в этих случаях концентрации Ni^{2+}) было отмечено частичное разделение групп листочков, развитие хлороза, отпадение корней, снижение тургора. В концентрированном растворе процесс потери зелёной окраски шел быстрее, чем в разбавленном. При этом у дочерних листочков, как правило, хлорозу подвергался проксимальный участок листочка, ближе к узлу; сама зона узла оставалась зелёной (рисунок 7.2, б). Следует отметить, что в концентрированной смеси с кальцием материнские листочки сохраняли более интенсивную зеленую окраску, чем в растворах без кальция (доля зелёного канала на фотографиях была выше на 5-6 %) (рисунок 7.2, в и г).

Формирование новых листецов не наблюдалось, происходил лишь рост почек.



Рисунок 7.2 – Внешний вид листецов ряски крошечной: *а*) – до пересадки в растворы; *б*) – после 5 суток в растворе никеля, 1 мг/л; *в*) – после 5 суток в растворе никеля, 10 мг/л; *г*) – в смеси $\text{Ni}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ (концентрация металлов 10 мг/л) после 5 суток

Гистохимический анализ не выявил принципиальных различий в распределении никеля в листецах после пребывания в растворах металла и смесях с кальцием (рисунок 7.3).



Рисунок 7.3 – Листецы, обработанные диметилглиоксимом, после 5 суток пребывания в растворах никеля, 1 мг/л – *а*) и смеси $\text{Ni}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$, 1 мг/л – *б*)

Спустя сутки после пересаживания листецов на питательную среду повторная обработка растений раствором диметилглиоксима показала, что листецы практически полностью освобождаются от тяжелого металла: некоторое его количество выявлялось в проводящей системе и корне (рисунок 7.4, *б*) [197].



а) общий вид листеца

б) поверхность листеца, окрашена жилка

Рисунок 7.4 – Листецы после суток пребывания в питательной среде, обработанные диметилглиоксимом

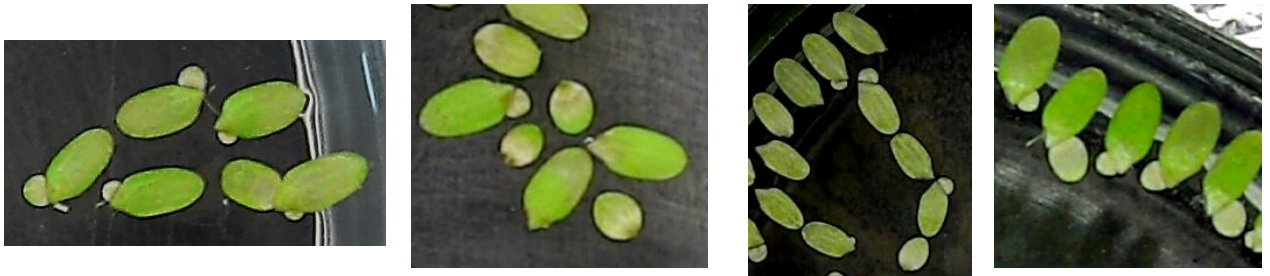
В процессе наблюдений за пересаженными листецами было отмечено дальнейшее развитие хлороза как у дочерних, так и у материнских листецов (рисунок 7.5, *а* и *б*). Однако, у последних обесцвечивание шло с меньшей скоростью. Кроме того, у дочерних происходило разрушение тканей в проксимальной части. Листецы, пересаженные со смеси $\text{Ni}:\text{Ca}$, с концентрацией 10 мг/л, проявляли замедленную интенсивность развития хлороза по сравнению с растениями, пребывавшими в концентрированном растворе никеля (рисунок 7.5).

Регенерация наблюдалась начиная с 6-8 суток после пересадки (рисунок 7.6, *а*) у листецов, находившихся в смеси $\text{Ni}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ с концентрацией металлов 1 мг/л. Растения, выдержанные в растворе никеля 5 суток, после пересадки на питательную среду начали формировать новые листецы на 9-10 сутки (рисунок 7.6, *б*): такую способность показал лишь один материнский листец с одной чашки из 3-х.

Листецы, находившиеся в растворе Ni^{2+} , 10 мг/л, после пересадки потеряли пигментацию, ни одной новой почки в течение месяца наблюдений у таких растений обнаружено не было (рисунок 7.7, *а*). После пребывания в смеси никель:кальций с той же концентрацией металлов на 9-10 сутки было отмечено формирование новой почки у материнского листеца в одной из чашек (отмечена белой стрелкой на рисунке 7.7, *б*).

Интересно отметить, что листецы, сформировавшиеся после пересадки, весьма рано сами образовывали дочерние растения (рисунок 7.8): в длину такие листецы были от 1,9-3 мм, а в ширину 0,9-1,3 мм. Для этого вида ряски в процессе роста на питательной среде было отмечено, что одиночные листецы формируют дочерние, достигнув 4-5 мм в длину и 2-2,5 мм в ширину (рисунок 7.8, *б*).

В итоге к 30 суткам регенерация листецов происходила у растений, находившихся в растворах никеля с концентрацией металла 1 мг/л и смеси $\text{Ni}:\text{Ca}$ (концентрация металлов составляла 1 и 10 мг/л).



а) Ni:Ca, 1 мг/л

б) Ni²⁺ 1 мг/лв) Ni²⁺, 10 мг/л

з) Ni:Ca, 10 мг/л

Рисунок 7.5 – Внешний вид листочков после пересадки на питательную среду и культивировании в течение 2 суток

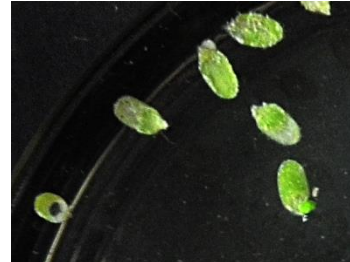
а) Ni²⁺:Ca²⁺, 1 мг/л, 8 суткиб) Ni²⁺, 1 мг/л, 10 сутки

Рисунок 7.6 – Регенерация листочков ряски крошечной в питательной среде

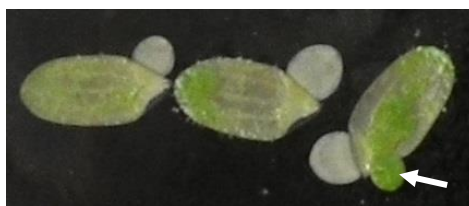
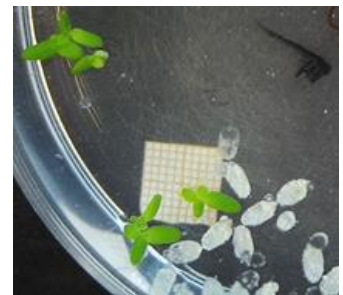
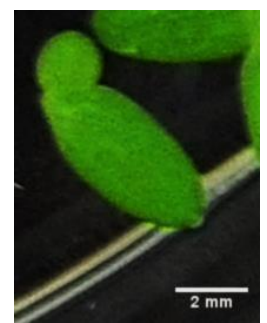
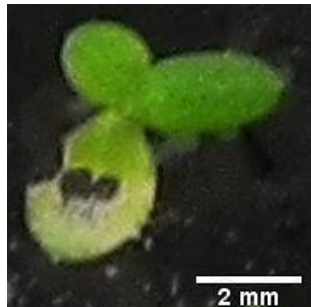
а) Ni²⁺, 10 мг/л, 30
суткиб) Ni²⁺:Ca²⁺, 10 мг/л, 10 суткив) Ni²⁺:Ca²⁺, 10 мг/л, 30 сутки

Рисунок 7.7 – Внешний вид листочков, регенерация на питательной среде



а)

б)

а) регенерация листочков ряски крошечной на 13 сутки после пребывания в смеси Ni:Ca, 1 мг/л; б) общий вид листочков ряски крошечной, постоянно культивируемой на питательной среде Хогланда

Рисунок 7.8 – Общий вид листочков ряски крошечной

Новые организмы формировались от пересаженных материнских и дочерних листецов. Помимо уже отмеченного более быстрого формирования регенерантами дочерних листецов, морфологически регенеранты отличались от листецов, выращенных на питательной среде, слабым развитием аэренхимы (рисунок 7.9).

Количественные результаты регенерации представлены в таблице 7.1. В целом, численность листецов и групп (от 2 и более объединенных листецов), регенерировавших после пребывания в растворе и смесях никеля и кальция достоверно не отличались между собой ($H = 2,43$ и $p=0,30$ – для листецов; $H= 2,54$ и $p=0,28$ – для групп) [197].

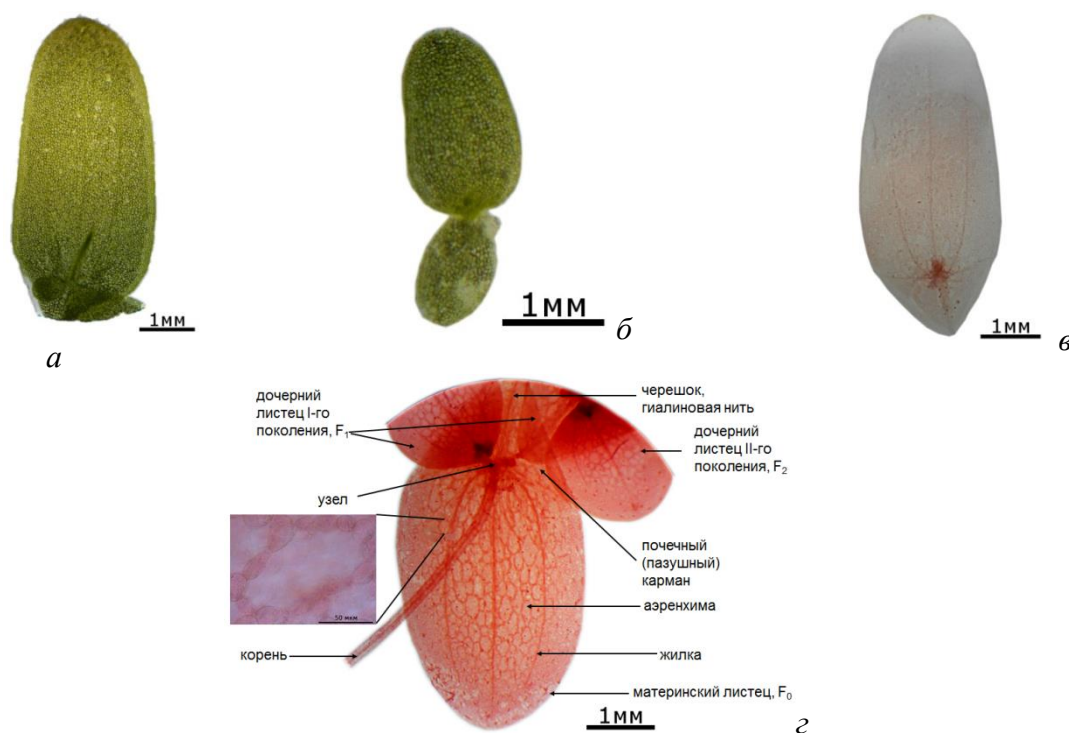


Рисунок 7.9 – Морфология регенерировавших листецов ряски крошечной а)-в), г) – контроль

Таблица 7.1 – Количество регенерировавших листецов и групп *L. perpusilla* после пребывания в растворах и смесях никеля

Концентрации растворов/смесей, мг/л	Ni, 1	Ni, 10	Ni:Ca, 10	Ni:Ca, 1
Листецы, шт.	24±4,24	-	15,5±9,19	32,5±12,02
Группы, шт.	8,5±2,12	-	5±2,83	11,5±4,95

Представлены средние значения и их стандартные отклонения, $n=3$

Регенерация ряски малой

Изменения листецов ряски малой в растворах никеля и в смеси с кальцием, в целом, были аналогичны тем, что фиксировались у ряски малой: снижение интенсивности зелёной окраски, развитие хлороза, диссоциация групп (рисунок 7.10, б-в). Существенные отличия были отмечены в варианте с концентрированным раствором никеля (10 мг/л): диссоциация групп составляла не более 10 % от исходного количества групп и практически полное отсутствие отделения корней (рисунок 7.10, г). Во время пребывания листецов в растворах никеля с концентрациями 1 г/л, а также в растворах никеля с добавлением нитрата кальция (концентрация ионов Ca^{2+} равнялась в этих случаях концентрации Ni^{2+} – 1 и 10 мг/л) была отмечена частичная диссоциация групп, снижение интенсивности зелёной окраски листецов на 8-9 %, развитие хлороза и некроза.

Листецы, после пребывания в растворах и смесях никеля с кальцием, интенсивно накапливали металл, о чем говорит интенсивное окрашивание после обработки диметилглиоксимом (рисунок 7.11). Было отмечено, что интенсивность окрашивания листецов из растворов была немного выше, чем из смесей. Спустя сутки после пересадки на питательную среду растения показывали некоторое наличие металла, особенно в корнях (рисунок 7.11, в).

Отмеченное ранее особое поведение групп листецов ряски малой в концентрированном растворе никеля ($C = 10$ мг/л) – незначительный процент диссоциации и отпадения корней – сохранилось до конца наблюдений. Видимыми признаками токсического действия металла были: развитие хлороза и некроза, интенсивнее процесс шёл у дочерних листецов (рисунок 7.12, а). При этом после смеси Ni:Ca ($C = 10$ мг/л) наблюдали и диссоциацию, и отпадение корней (рисунок 7.12, б). Тем не менее, процесс формирования новых листецов протекал у растений, находившихся в течение 5 суток именно в смеси никель:кальций [197].



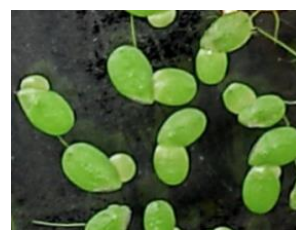
а) внешний вид
листецов ряски малой
до пересадки в
растворы



б) Ni:Ca, 1 мг/л, 5 сутки



в) Ni:Ca, 10 мг/л,
5 суток



г) Ni²⁺, 10 мг/л,
5 суток

Рисунок 7.10 – Внешний вид листецов ряски малой



а) Ni²⁺, 10 мг/л, 5 сутки



б) Ni:Ca, 10 мг/л, 5 сутки



в) листец, находившийся в
растворе Ni²⁺, 10 мг/л, после 1
суток пребывания в
питательной среде

Рисунок 7.11 – Листецы ряски малой, обработанные раствором
диметилглиоксимома



а



б

Рисунок 7.12 – Внешний вид листецов ряски малой: а) после раствора Ni²⁺, 10 мг/л, на 30 сутки; б) после смеси Ni:Ca, 10 мг/л, на 30 сутки

Результаты эксперимента представлены в таблице 7.2. Так же, как и в случае с ряской крошечной, количество листецов и групп, сформировавшихся после пребывания в растворе никеля ($C=1$ мг/л), и смесях никель:кальций (C металлов 1 и 10 мг/л) статистически не отличались между собой ($H=0,29$ и $p=0,87$ – для листецов; $H=0,50$ и $p=0,78$ – для групп).

Регенерация растений после нахождения в растворе тяжелого металла $C = 10$ мг/л полностью отсутствовала.

Таблица 7.2 – Количество регенерировавших листочков и групп *L. minor* после пребывания в растворах и смесях никеля

Концентрации растворов/смесей, мг/л	Ni, 1	Ni, 10	Ni:Ca, 10	Ni:Ca, 1
Листочки, шт.	44±1,41	-	48±32,53	66±33,94
Группы, шт.	14,50±0,71	-	19±14,14	23±12,73

Представлены средние значения и их стандартные отклонения, $n=3$

7.2. Регенерация после растворов солей кадмия и смесей кадмий:кальций

Картина внешних изменений листочков рясок в растворах кадмия (1 и 10 мг/л), а также смесях кадмий:кальций (концентрации металлов 1 и 10 мг/л) была аналогичной той, что и в случае с никелем: хлорозы/некрозы, диссоциация групп листочков в разбавленных растворах и концентрированной смеси и незначительный процент диссоциировавших групп ряски малой в концентрированном растворе.

Гистохимически кадмий выявлялся в тканях листочков сразу после 5 суток в растворах, однако, в небольших количествах.

После пересадки листочков на питательную среду и культивирования случаи регенерации полностью отсутствовали у представителей обоих видов.

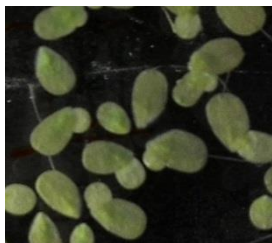
7.3. Регенерация после растворов солей меди и смесей медь:кальций

Изменения во внешнем виде листочков рясок и процессы диссоциации групп в растворах и смесях меди были аналогичны описанным выше. Хлороз у ряски малой в концентрированных растворах развивался интенсивнее, чем в разбавленных: была отмечена значимая ($p < 0,05$) 3-6 % разница в яркости зеленого канала на фотографиях листочков (рисунок 7.13). Для ряски крошечной подобных различий обнаружено не было. Общее падение яркости зеленого цвета составляло 10-15 %.

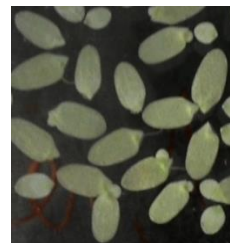
Ряска крошечная

Гистохимический анализ показал интенсивное накопление меди в вегетативной ткани материнских листецов, корнях. У дочерних листецов также окрашивались вегетативные ткани, отделительная зона. В концентрированных растворах и смесях интенсивность окраски была выше, чем у листецов из разбавленных растворов. Однако по насыщенности окраски разницы между листецами из растворов и смесей обнаружено не было (рисунок 7.14) [197].

На следующие сутки после пересадки некоторое количество металла выявлялось в тканях листецов, преимущественно дочерних, корнях (рисунок 7.15).



а) листецы ряски малой



б) листецы ряски крошечной

Рисунок 7.13 – Внешний вид листецов рясок в растворе меди Cu 10 мг/л, 5 сутки



а) $C_{Cu} = 1$ мг/л,



б) $C_{Cu} = 10$ мг/л

Рисунок 7.14 – Сравнение листецов материнских листецов ряски крошечной по интенсивности окрашивания диэтилдитиокарбаматом натрия после 5 суток пребывания в растворах меди



а) дочерний листец, $C_{Cu} = 1$ мг/л



б) материнский листец, $C_{Cu} = 10$ мг/л

Рисунок 7.15 – Гистохимические препараты листецов ряски крошечной после 1 суток в питательной среде

В течение 30-ти суточного культивирования с еженедельным пересаживанием на свежую питательную среду случаев регенерации обнаружено не было, все листецы – материнские и дочерние – погибли.

Ряска малая

Исследование листецов на содержание меди в тканях показало, что у материнских растений из концентрированного раствора и смеси меди присутствует, в основном, в корне, отделительной зоне, в то время как в основных тканях медь содержится в небольших количествах (рисунок 7.16, *а*).

Вероятно, это может быть связано с тем, что на 5 сутки основная масса клеток погибает, и происходит сброс металла в раствор. Клеточные стенки корней пассивно удерживают медь. У листецов из разбавленных растворов и смесях металл выявлялся как в корнях, так и в вегетативных тканях (рисунок 7.16, *б*).

Выдержка в течение 1 суток на питательной среде Хогланда привела к тому, что у листецов из раствора с концентрацией 10 мг/л изменился характер распределения окраски, и, следовательно, меди в клетках и тканях: стала окрашиваться основная масса растений, а в корнях металл выявлялся в небольших количествах (рисунок 7.17, *а*). У листецов из менее концентрированных растворов интенсивность окрашивания снизилась (рисунок 7.17, *б*) [197].

Формирование новых почек было зарегистрировано на 8-9 сутки после пересадки из разбавленных растворов и смесей лишь у дочерних листецов (рисунок 7.18, *а*). В дальнейшем эти листецы давали почки, которые, в свою очередь, становились материнскими листецами для следующих поколений рясок (рисунок 7.18, *б*).

Процесс шел медленно, неравномерно, но непрерывно: к 30-м суткам сформировались новые групп листецов, и в тоже время некоторые дочерние листецы только начали продуцировать новые почки. Пересаженные

материнские листецы новых почек не дали. Растения из концентрированных растворов погибли: ни дочерние, ни материнские новых почек не сформировали.



Рисунок 7.16 – Листецы ряски малой после 5 суток пребывания в растворе меди. Окрашивание диэтилдитиокарбаматом

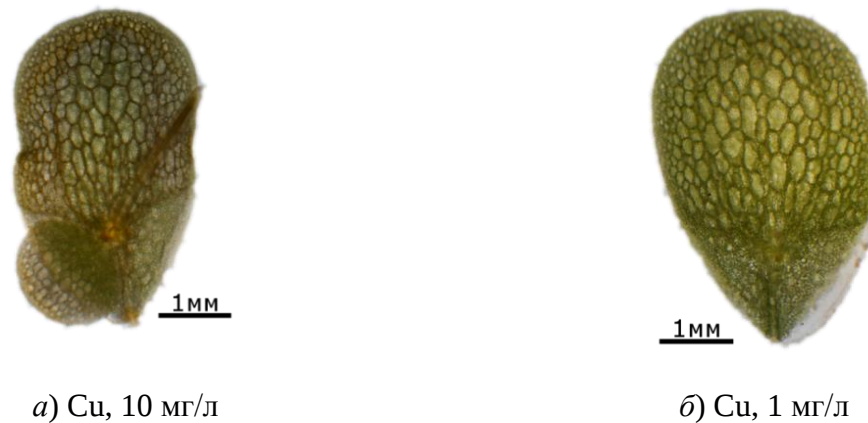


Рисунок 7.17 – Результаты обработки карбаматом натрия листецов ряски малой после суток в питательной среде



Рисунок 7.18 – Регенерация ряски малой после выдержки в смеси $Cu:Ca, 1 \text{ мг/л}$ – а) и б) и растворе $Cu, 1 \text{ мг/л}$

Количества регенерировавших листецов и групп представлены в таблице 7.3. Значимых различий в вариантах после раствора и смеси с концентрациями металлов 1 мг/л выявлено не было ($H=0,43$ и $p=0,51$ – для листецов; $H=1,19$ и $p=0,28$ – для групп) [197].

Таблица 7.3 – Количество регенерировавших листецов и групп ряски малой после пребывания в растворах и смесях меди

Концентрации растворов/смесей, мг/л	Cu, 1	Cu, 10	Cu:Ca, 10	Cu:Ca, 1
Листецы, шт.	9,67±6,36	-	-	11±3,54
Группы, шт.	5±0,71	-	-	6±1,41

Представлены средние значения и их стандартные отклонения, $n=3$

Пребывание растений ряски малой и крошечной в растворах никеля и смесях никеля и кальция привело к развитию хлороза/некроза. Действительно, известно, что тяжелые металлы вызывают уменьшение содержания в клетках фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а и b, каротиноидов), растворимых цитоплазматических белков. Но вместе с тем на действие металлов рясковые отвечают некоторым повышением активности антиоксидантных ферментов [36]. Поэтому можно говорить об окислительном стрессе, который вызывают металлы в клетках рясковых. Несмотря на то, что после пересадки и выдержки уже в течение суток в питательной среде листецы сбрасывают большую часть накопленного металла, в процессе дальнейшей культивации отмечался хлороз и даже полное разрушение проксимальной части у некоторых дочерних листецов ряски крошечной. Такие явления свидетельствуют о том, что поражения клеток от металлов оказались слишком серьёзными, чтобы растения смогли восстановиться даже после прекращения действия токсиканта.

Описанная особенность процесса регенерации – ускоренная продукция дочерних почек/листецов регенерантами – может быть объяснена нарушениями во взаимодействии между вегетативными тканями материнского листеца и меристемой почечного кармашка. В работах Эбши (E. Ashby), Вангерманн (E. Wangermann), Вицтума (A. Witztum) [60, 63, 130,

179] было показано, что дистальная вегетативная часть материнского листеца рясковых оказывает воздействие на развивающиеся почки посредством некоторых химических сигналов, возможно, гормональных, посредством индолилуксусной кислоты. Это влияние заключается в замедлении роста почек до определенного момента. В экспериментах по регенерации разрушенные вегетативные ткани материнских листецов, очевидно, не оказывали ингибирующего действия на развивающиеся в пазушных кармашках новые растения, в связи с чем последние быстрее развивались и быстрее сами становились материнскими для нового поколения листецов. Рясковые являются неотеническими формами по своей природе [52], вероятно, поэтому для них такое ускоренное развитие является возможным.

Сравнение способностей растений этих двух видов к регенерации после действия тяжелых металлов показывает, что большей устойчивостью обладает ряска малая: лишь её листецы оказались способны к продукции новых растений после пребывания в растворах и смесях меди, 1 мг/л, кроме этого, количество листецов *L. minor*, сформировавшихся после пересадки с растворов и смесей с никелем, оказалось выше, чем в случае с ряской крошечной. Вероятно, это объясняется морфологическими особенностями растений: большей толщиной листецов ряски малой – $0,57 \pm 0,01$ мм против $0,32 \pm 0,01$ мм у крошечной, лучшей изолированностью меристематических клеток.

Факты регенерации свидетельствуют о том, что меристематические клетки в основании листецов, как дочерних, так и материнских, в среднем, оказываются более устойчивы к тяжелым металлам, чем вегетативные клетки из дистальных отделов. Такая устойчивость может определяться либо различной чувствительностью вегетативных и меристематических тканей растений к химическим агентам, либо аккумуляцией и, возможно, последующей детоксикацией ионов металлов различными тканями. Как показали ультраструктурные исследования [62] имеются различия в строении клеток разных зон листецов, а также листецов разных возрастов

(рисунок 1.5). Меристематические клетки молодых листецов, образующие проксимальную зону, обладают крупными ядрами округлой формы с хорошо оформленным ядрышком. Это говорит о высокой физиологической активности клетки. Вегетативные ткани зрелых листецов образованы клетками с ядрами неправильной формы без ядрышек.

Кроме этого, как показали данные гистохимического исследования, проведенного на вольфии бескорневой, её листецы имеют на поверхности особую полисахаридную кутикулу, которая защищает растения от внешних воздействий. Показано, что морфология кутикулы, а, возможно, и состав, имеет гетерогенный характер и различается на отдельных участках поверхности (рисунок 7.19) [198, 199]. Вероятно, подобный защитный полисахаридный слой имеется и у представителей рода *Lemna*.

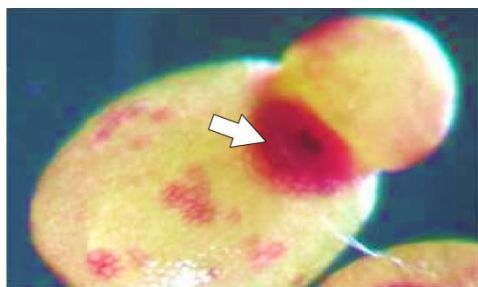


Рисунок 7.19 – Распределение зон окрашивания рутениевым красным на поверхности растений вольфии бескорневой *Wolffia arrhiza* L. Интенсивно окрашена проксимальная, меристематическая зона дочернего листеца (указана стрелкой), что говорит о высокой плотности защитной кутикулы [198]

Особого внимания заслуживают эффекты кальция. Отмеченное в некоторых случаях замедленное развитие хлороза и, самое главное, регенерация листецов в концентрированных смесях могут быть объяснены конкуренцией ионов кальция и ионов тяжелых металлов за сайты связывания и проникновения в клетки. К настоящему времени в литературе эти вопросы проработаны достаточно полно [74-76]. Предлагаются три механизма защитного, смягчающего действия кальция. Первый механизм основан на снижении поверхностного электрического мембранного потенциала ψ_0 за счет связывания катионов кальция с отрицательно заряженными гидрофильными головками фосфолипидов мембраны. Снижение

отрицательного заряда на внешней клеточной поверхности, в свою очередь, приводит к уменьшению силы притяжения катионов тяжелых металлов и их диффузии в клетки. Вторым типом снижения токсичности тяжелых металлов кальций связывают с тем, что кальций в норме является необходимым компонентом мембран их структурирующим. Тяжелые металлы могут вытеснять кальций из сайтов на мембране, что приводит к нарушению её целостности и проявляется в развитии различных патологических процессов. Добавление кальция, поэтому, способно восстановить целостность цитоплазматической мембраны и снизить поступление тяжелых металлов в клетки. Третья группа защитных механизмов, как полагается, связана со спецификой действия каждого конкретного токсиканта.

Хотя приведенные выше механизмы сформулированы на основе экспериментов на корнях наземных растений, правомочным, на наш взгляд, будет их применение и к рясковым, т. к. нижняя поверхность листецов фактически и выполняет функции корней [58].

Группы листецов рясок вида *L. minor* в растворах металлов с концентрацией 10 мг/л показали низкий процент диссоциации по сравнению с теми, которые находились в разбавленных растворах и концентрированных смесях металл:кальций. Для объяснения таких результатов рассмотрим механизм отделения листецов рясковых друг от друга, реализующийся в норме. Дочерние и материнские листецы в группе соединяются черешком, или гиалиновой нитью. Последняя состоит из 4-5 рядов прямоугольных клеток. Эти клетки содержат особые структуры – миелиновые фигуры, которые представляют собой несколько мембранных пузырьков один в другом, по типу матрешки. Предположительно, эти образования содержат гидролитические ферменты, разрушающие срединную пластинку клеточных стенок соседних клеток, что и приводит к диссоциации группы [62] (рисунок 7.20).



Рисунок 7.20 – Клетки отделительной зоны ряски крошечной: Му – миелиновые фигуры; ML – срединная пластинка; CW – клеточная стенка; Ср – хлоропласт [62]

Высвобождение этих ферментов происходит, когда дочерний листец достигает определенных размеров, созревает. Тогда можно предположить следующий механизм разъединения групп в растворах и смесях металлов с кальцием. В разбавленных растворах и смесях (1 мг/л) тяжелые металлы, проникая в клетки, вызывают окислительный стресс, в частности, перекисное окисление липидов и повреждают миелиновые фигуры в гиалиновых нитях. Высвобождающиеся ферменты разрыхляют оболочки клеток, что приводит к отделению дочерних листцов от материнских. Вероятно, в концентрированных растворах токсиканты, помимо преждевременного высвобождения гидролаз из миелиновых фигур, вызывают и денатурацию самих этих ферментов, тем самым блокируя процесс диссоциации. Кроме того, тяжелые металлы в высоких концентрациях, возможно, образуют межмолекулярные сшивки полимеров клеточных стенок, упрочняя их. Кальций, конкурируя с ионами тяжелых металлов и защищая растения, тем не менее, по всей видимости, не препятствует выходу ферментов из вакуолей, что и приводит к отделению дочерних листцов от материнских.

Группы ряски крошечной диссоциировали с одинаковой интенсивностью в разных растворах и смесях. Возможно, это связано с разным химическим составом клеточных стенок рассматриваемых видов и

особенностями почечных кармашков – сила сцепления дочернего листеца и стенок кармашка ряски малой может быть выше, чем у ряски крошечной.

ВЫВОДЫ

Установлено, что регенерация возможна у ряски малой и крошечной после пребывания в концентрированной смеси никеля с кальцием (10 мг/л), а также в разбавленных растворах и смесях никеля (1 мг/л) в течение 5 суток. Ряска малая показала способность к регенерации после растворов меди и её смесей с концентрацией металлов 1 мг/л. Токсичность кадмия оказалась слишком высокой: регенерация отсутствовала у обоих видов во всех вариантах.

Гистохимический анализ показал, что после пересадки растений с растворов и смесей на питательную среду происходит десорбция металлов из тканей.

Регенеранты отличались ускоренным развитием: они раньше, чем растения, постоянно выращиваемые на питательной среде, формировали дочерние почки/листецы, становясь, таким образом, материнскими растениями.

Сравнение способностей растений этих двух видов к регенерации после действия тяжелых металлов показывает, что большей устойчивостью обладает ряска малая.

Таким образом, несмотря на морфологическую простоту и небольшие размеры рясковых можно отметить достаточно сложное их взаимодействие с ионами тяжелых металлов. Ткани листецов разных возрастов обладают разной чувствительностью и, вероятно, разными механизмами устойчивости и детоксикации данных поллютантов. Даже в экстремальных условиях – растворах тяжелых металлов – популяция рясок сохраняет достаточное количество жизнеспособных меристематических клеток, способных дать начало новым организмам.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Токсическое действие изученных металлов сильнее проявляется с увеличением их концентрации и зависит от размеров ионов, их жесткости и способности взаимодействовать с серу содержащими веществами клеток. Рассмотренные металлы (особенно кадмий), оказывают значимое негативное влияние на вегетативное размножение и уменьшение линейных размеров листецов, то есть действуют как на популяционном, так и на организменном уровнях. Листецы ряски крошечной дифференцировано реагируют на присутствие различных металлов в среде: для материнских листецов более токсичны медь и кадмий, для дочерних – никель.

2. Установлена возможность применения гистохимических методов анализа для выявления тяжелых металлов в тканях и органах растений рясок малой и крошечной. Показано, что дочерние листецы ряски крошечной накапливают медь и кадмий преимущественно в дистальном отделе. Карбаматный реагент, впервые предложенный для селективного обнаружения ионов меди в растительных тканях, адекватно выявляет наличие данного металла.

3. Оценка воздействия УФ-излучения ($\lambda=253,7$ нм) и ПМП (напряженностью 2 и 4 кА/м) на рост, развитие и морфологию ряски крошечной показала, что УФ снижал скорость вегетативного размножения растений, вызывал хлороз, деформацию листецов, одновременно в $\sim 1,3$ раза повышая проницаемость мембран. ПМП на ряску крошечную значимого влияния не оказало.

4. Динамика поверхностных потенциалов ряски крошечной в растворах солей меди с $C=10$ мг/л отличается нелинейным характером и обусловлена формированием концентрационных градиентов у поверхности листецов; анионный состав солей на ход потенциала влияет незначительно. В разбавленном растворе $C_{Cu^{2+}}=0,1$ мг/л имеет место лишь постепенная диффузия меди в листецы, при этом значительные перепады концентраций металла отсутствуют. Совместное влияние солей меди и УФ, благодаря

влиянию излучения на проницаемость мембран ряски способствует изменению динамики биопотенциала растения.

5. Растения рясок рода *Lemna* L. сохраняют способность к регенерации и воспроизводству после пребывания в простых (соли меди, никеля) и смешанных растворах (с кальцием) металлов в концентрациях на 2 порядка превышающих величины ПДК. Процесс регенерации сопровождается десорбцией накопленных металлов обратно в раствор, при этом кальций оказывает протекторное действие на растения в отношении меди и никеля.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ РЯСКИ КРОШЕЧНОЙ В КАЧЕСТВЕ ФИТОРЕМЕДИАЦИОННОГО АГЕНТА

1. Ряску крошечную можно рекомендовать для очистки сточных вод с невысоким содержанием кадмия.
2. Ряску крошечную можно рекомендовать в качестве тест-объекта для обнаружения в водных средах высоких концентраций никеля.
3. Для контроля за процессом накопления тяжелых металлов ряской на очистных биопрудах, а также для оценки загрязнения естественных водных объектов можно рекомендовать использовать гистохимические методы анализа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GUS β-глюкуронидаза
АТФ аденозинтрифосфорная кислота
АТФаза аденозинтрифосфатаза
БЭП биоэлектрический потенциал
ВП переменные потенциалы
ИТМ ионы тяжелых металлов
ИУК индолилуксусная кислота
МП мембранный потенциал
ПД потенциал действия
ПП потенциал покоя
ТМ тяжелые металлы
ЭДТА этилендиаминтетрацетат
рН – кислотность раствора
С – концентрация, мг/л
Е – потенциал, мВ
t °С – температура по Цельсию
УФ – ультрафиолетовое излучение
ПМП – постоянное магнитное поле

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schröder, P. Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe [Text] / P. Schröder, J. Navarro-Aviñó, H. Azaizéh // Environmental Science and Pollution Research. – 2007. – № 14 (7). – P. 490-497.
2. Investigating Duckweed for Phytoremediation and as a Toxicity Indicator of Chemicals [Электронный ресурс]: Duckweed Research. – Режим доступа: <http://duckweedresearch.blogspot.ru/2011/01/investigating-duckweed-for.html> (27.10.2014).
3. Фиторемедиационные энергосберегающие технологии в решении проблем загрязнения гидросферы [Текст] / Л.Н. Ольшанская, Н.А. Собгайда, М. Л. Русских и др. // Инноватика и экспертиза. – 2012. – № 2 (9). – С. 166-172.
4. Hooda, V. Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water [Text] / V. Hooda // Journal of Environmental Biology. – 2007. – 28(2). – P. 367-376.
5. Jadia, Ch. D. Phytoremediation of heavy metals: recent techniques [Text] / Ch. D. Jadia, M. H. Fulekar // African Journal of Biotechnology. – 2009. – V. 8 (6). – P. 921-928.
6. Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*) [Text] / J. R. Clark, J. H. Vanhassel, R. B. Nicholson, et al. // Ecotoxicology and environmental safety. – 1981. – № 5. – P. 87-96.
7. Garg, P. The duckweed *Wolffia globosa* as an indicator of heavy metal pollution: sensitivity to Cr and Cd [Text] / P. Garg, P. Chandra // Environmental monitoring and assessment. – 1994. – № 29. – P. 89-95.
8. Miranda, M. G. Uptake of lead by *Lemna gibba* L.: Influence on specific growth rate and basic biochemical changes [Text] / M. G. Miranda, K. Llangovan // Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. – 1996. – № 56. – P. 1000-1007.

9. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation [Text] / M. N. V. Prasad, P. Malec, A. Waloszek et al. // Plant Science. – 2001. – № 161. – P. 881-889.
10. Mkandawire, M. Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents? [Text] / M. Mkandawire, E. G. Dudel // Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability. – 2007. – V. 1(1). – P. 56-71.
11. Khellaf, N. Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution [Text] / N. Khellaf, M. Zerdaoui // Iranian journal of environmental health science & engineering. – 2009. – V. 6. – № 3. – P. 161-166.
12. Gopalapillai, Y. Effect of major cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+}) and anions (SO_4^{2-} , Cl^{-} , NO_3^{-}) on Ni accumulation and toxicity in aquatic plant (*Lemna minor* L.): Implications for Ni risk assessment [Text] / Y. Gopalapillai, B. Hale, B. Vigneault // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2013. – V. 32, – № 4. – P. 810-821.
13. Drost, W. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time-dependence of growth inhibition and the recovery after exposure [Text] / W. Drost, M. Matzke, T. Backhaus // Chemosphere. – 2007. – V. 67(1). – P. 36-42.
14. Raskin, I. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment [Text] / I. Raskin, R. D. Smith, D. E. Salt // Plant biotechnology. – 1997. – № 8. – P. 221–226.
15. Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment [Text] / E. Maestri, M. Marmiroli, G. Visioli et al. // Environmental and Experimental Botany. – 2010. – V. 68. – P. 1-13.
16. Медведев, С. С. Физиология растений: учебник [Текст] / С. С. Медведев. – СПб.: Изд-во СПб ун-та, 2004. – 336 с.
17. About us [Электронный ресурс]: *Lemna Technologies, INC.* - wastewater treatment, infrastructure, engineering. – Режим доступа: <http://www.Lemnatechnologies.com/> (27.10.2014).

18. *Lemna* Wastewater Treatment Facility [Электронный ресурс]: City of Devils Lake, North Dakota. – Режим доступа: <http://www.ci.devils-lake.nd.us/departments/Lemna.html> (27.10.2014).
19. Xu, J. The production of duckweed as a source of biofuels [Text] / J. Xu¹, H. Zhao, A.-M. Stomp et al. // *Biofuels*. – 2012. – V. 3(5). – 589-601.
20. Cui, W. Growing duckweed for biofuel production: a review [Text] / W. Cui, JJ. Cheng // *Plant biology*. – 2014. – V. 1. – P. 1-8.
21. Mojiri, A. Phytoremediation of heavy metals from municipal wastewater by *Typha domingensis* [Text] / A. Mojiri // *African Journal of Microbiology Research*. – 2012. – V. 6(3). – P. 643-647.
22. Nayyef, M. A. Efficiency of duckweed (*Lemna minor* L.) in phytotreatment of wastewater pollutants from Basrah oil refinery [Text] / M.A. Nayyef, A. A. Sabbar // *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*. – 2012. – V. 1. – № 4. – P. 163-172.
23. Jafari, N. Effect of pH and metal concentration on phytoaccumulation of zinc by three duckweeds species [Text] / N. Jafari, M. Akhavan // *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. – 2011. – V. 10 (1). – P. 34-41.
24. Khellaf, N. Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation [Text] / N. Khellaf, M. Zerdaoui // *Ecotoxicology*. – 2010. – V. 19. – P. 1363–1368.
25. Kaur, L. Role of pH in the accumulation of lead and nickel by common duckweed (*Lemna minor*) [Text] / L. Kaur, K. Gadgil, S. Sharma // *International Journal of Bioassays*. – 2012. – № 1. – P. 191-195.
26. Capacity of the macrophytes *Lemna minor* and *Eichhornia crassipes* to remove nickel / P. Bres, D. Crespo, P. Rizz et al. // *Agricultural Research Journal*. – Режим доступа: <http://ria.inta.gov.ar/english/wp-content/uploads/2012/04/Bh-10067-Bres-inglespress.pdf> (27.10.2014).

27. Ozengin, N. Performance of duckweed (*Lemna minor* L.) on different types of wastewater treatment [Text] / N. Ozengin, A. Elmaci // Journal of Environmental Biology. – 2007. – V. 28. – P. 307-314.
28. Singh, D. Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants [Text] / D. Singh, A. Tiwari, R. Gupta // Journal of Agricultural Technology. – 2012. – V. 8(1). – P. 1-11.
29. Dixit, A. Process and plants for wastewater remediation: a review [Text] / A. Dixit, S. Dixit, C. S. Goswami // Scientific Reviews & Chemical Communications. – 2011. – № 1(1). – P. 71-77.
30. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation [Text] / K.-J. Appenrotha, K. Krecha, Á.Keresztesb et al. // Chemosphere. – 2010. – V. 78. – P. 216–223.
31. Tran, T. A. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects [Text] / T. A. Tran, L. P. Popova // Turkish Journal of Botany. – 2013. – V. 37. – P. 1-13.
32. Aquatic phytoremediation of CCA and copper contaminated water / C. Keith, H. Borazjani, S.V. Diehl, et al. // 37th Annual Mississippi Water Resources Conference [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.wrri.msstate.edu/pdf/keith07.pdf>.
33. Assessment of the efficiency of duckweed (*Lemna gibba*) in wastewater treatment [Text] / W. A. El-Kheir, G. Ismail, F. A. El-Nour et al. // International journal of agriculture & biology. – 2007. – V. 9. – №. 5. – P. 681-687.
34. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*) [Text] / W. Hou, X. Chen, G. Song et al. // Plant physiology and biochemistry. – 2007. – № 45. – P. 62-69.
35. Cedergreen, N. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor* [Text] / N. Cedergreen, T. V. Madsen // New Phytologist. – 2002. – № 155. – P. 285–292.

36. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation [Text] / M.N.V. Prasad, P. Malec, A. Waloszek et al. // Plant Science. – 2001. – № 161. – P. 881-889.

37. Patel, D. K. Phytoremediation potential of duckweed (*Lemna minor* L.: a tiny aquatic plant) in the removal of pollutants from domestic wastewater with special reference to nutrients [Text] / D. K. Patel, V. K. Kanungo // The bioscan. – 2010. – № 5(3). – P. 355-358.

38. Phytotoxicity of atrazine herbicide to fresh water macrophyte duckweed (*Lemna perpusilla* Torr.) in Thailand [Text] / O-A. Phewnil, N. Tungkananurak, S. Panichsakpatana et al. // Environment and Natural Resources Journal. – 2012. – V. 10. – № 1. – P. 16-27.

39. Potential of macrophyte for removing arsenic from aqueous solution [Text] / F. P. Guimaraes, R. Aguiar, J. A. Oliveira et al. // Planta Daninha, Viçosa-MG. – 2012. – V. 30. – №. 4. – P. 683-696.

40. Removal of chromium from wastewater using macrophyte *Lemna minor* as biosorbent / L. K. dos S. Lima, S. J. Kleinübing, E. A. da Silva et al. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/pres2011-and-icheap10/PRES11/23Lima.pdf>.

41. Gürtekin, E. The role of duckweed (*Lemna minor* L.) in secondary clarifier tanks / E. Gürtekin, N. Şekerdağ // [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://oaji.net/articles/2014/1084-1418117778.pdf>.

42. Garg, P. The duckweed *Wolffia globosa* as an indicator of heavy metal pollution: sensitivity to Cr and Cd [Text] / P. Garg, P. Chandra // Environmental monitoring and assessment. – 1994. – № 29. – P. 89-95.

43. Miranda, M. G. Uptake of lead by *Lemna gibba* L.: Influence on specific growth rate and basic biochemical changes [Text] / M. G. Miranda, K. Llangovan // Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. – 1996. – № 56. – P. 1000-1007.

44. Diritgen, N. Effects of zinc and copper on growth and metal accumulation in duckweed, *Lemna minor* [Text] / N. Diritgen, Y. Inel. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. – 1994. – № 53. – P. 442-449.
45. Wolf, A. J. Effects of copper on the growth of *Lemna minor* (duckweed) [Text] / A. J. Wolf, B. S. Ryneerson, J. M. Sperry // Beloit College Journal of Plant Ecophysiology. – 2004. – V. 3. – P. 9-12.
46. Tolerance to heavy metals in the duckweed, *Lemna minor* [Text] / N. Khellaf, M. Zerdaoui, O. Faure et al. // [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://centrostudinatura.it/public2/documenti/290-60266.pdf>.
47. Khellaf, N. Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution [Text] / N. Khellaf, M. Zerdaoui // Iranian journal of environmental health science & engineering. – 2009. – V. 6. – №. 3. – P. 161-166.
48. Steveninck, R.F.M. Van. Heavy-metal (Zn, Cd) tolerance in selected clones of duckweed (*Lemna minor*) [Text] / R.F.M. Van Steveninck, M. E. Van Steveninck, D. R. Fernando // Plant and Soil. – 1992. – V. 146. – P. 271-280.
49. Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies [Text] / S. Mukherjeea, S. Mukherjeea, P. Bhattacharyya et al. // Environment International. – 2004. – №. 30. – P. 811-814.
50. Les, D. H. Systematics of the *Lemnaceae* (duckweeds): inferences from micromolecular and morphological data [Text] / D. H. Les, E. Landolt, D. J. Crawford // Plant Systematics and Evolution. – 1997. – V. 204. – P. 161-177.
51. Les, D. H. Phylogeny and Systematics of *Lemnaceae*, the Duckweed Family [Text] / D.H. Les, D. J. Crawford, E. Landolt // Systematic Botany. – 2002. – V. 27. – № 2. – P. 221-240.
52. Жизнь растений. В 6 т. Т. 6. Цветковые растения [Текст] / Гл. ред. А. Л. Тахтаджян. – М.: Просвещение, 1982. – 543 с.
53. Arber, A. The vegetative morphology of *Pistia* and the *Lemnaceae* [Text] / A. Arber // Proceedings of the Royal Society.- 1920.- V. 91.- № 1.- P. 96-103.

54. Duckweed Anatomy: the Structure of Duckweed Fronds [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://waynesword.edu/1wayindx.htm> (10.05.2014).
55. Растительная клетка [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://plant.geoman.ru/books/item/f00/s00/z00000000/st001.shtml>.
56. *Lemnaceae* – Images of *Lemna perpusilla* [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://waynesword.palomar.edu/imglepe.htm> (07.04.2014).
57. The Charms of Duckweed [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/duckweed.htm> (07.04.2014).
58. Leon, E. M. Influence of Plant Position on Growth of Duckweed [Text] / L. M. Leon, D. L. Sutton // Journal of Aquatic Plant Management. – 1985. – V.25. – P. 28-30.
59. Kandeler, R. Flowering in the *Lemna* System [Text] / R. Kandeler // Phyton. – 1984. – V. 24. – P. 113-124.
60. Witztum, A. Morphogenesis of asymmetry and symmetry in *Lemna perpusilla* Torr. [Text] / A. Witztum // Annals of Botany. – 1979. – V. 43. – P. 423-430.
61. Posner, H. B. Inhibitory effect of sucrose on flowering in *Lemna perpusilla* 6746 and mutant strain 1073 [Text] / H. B. Posner // Plant & Cell Physiology. – 1967. – №. 8. – P. 535-539.
62. Chiu, M. M. Ultrastructural Study on *Lemna perpusilla* [Text] / M. M. Chiu, R. H. Falk // Cytologia. – 1971. – V. 40. – P. 313-322.
63. Ashby, E. The effect of meristem aging on the morphology and behavior of fronds in *Lemna minor* [Text] / E. Ashby, E. Wangermann // Annals New York Academy of Sciences. – 1954. – V. 57. – № 1. – P. 476-483.
64. Stockey, R. A. The fossil monocot *Limnobiophyllum scutatum*: resolving the phylogeny of *Lemnaceae* [Text] / R. A. Stockey, G. L. Hoffman, G. W. Rothwell // American Journal of Botany. – 1997. – V. 84. – № 3. – P. 355-368.
65. Беркинблит, М. Б. Электричество в живых организмах [Текст] / М. Б. Беркинблит, Е. Г. Глаголева. – М.: Наука, 1988. – 98 с.

66. Медведев, С. С. Электрофизиология растений: учебное пособие [Текст] / С. С. Медведев. – СПб.: изд-во С.-Петербургского ун-та, 1997.-122 с.
67. Оприлов, В. А. Проблемы и перспективы изучения биоэлектрогенеза у высших растений [Электронный ресурс]– Режим доступа: http://www.unn.ru/pages/vestniki_journals/9999-0191_West_bio_2001/2.pdf (27.10.2014).
68. Практикум по физиологии и биохимии растений. Электрофизиология высших растений (внеклеточное отведение): учебно-методическое пособие [Текст] / В.Н. Воробьев. – Казань: Казанский университет, 2013. – 32 с.
69. Volkov, A. G. Plant electrophysiology. Theory and methods [Text] / Editor A. G. Volkov. – Berlin: Springer, 2006. – 508 p.
70. Оприлов, В. А. Биоэлектрогенез у высших растений [Текст] / В. А. Оприлов, С. С. Пятин, В. Г. Ретивин. – М.: Наука, 1991. – 214 с.
71. Оприлов, В. А. Электрические сигналы у высших растений [Текст] / В. А. Оприлов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 10. – С. 22-27.
72. Оприлов, В. А. Электричество в жизни животных и растений [Текст] / В. А. Оприлов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 9. – С. 40-46.
73. Ченцов, Ю. С. Введение в клеточную биологию: учебник для вузов [Текст] / Ю.С. Ченцов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: ИКЦ Академкнига, 2004. – 495 с.
74. Surface electrical potentials of root cell plasma membranes: implications for ion interactions, rhizotoxicity, and uptake [Text] / Y-M. Wang, T. B. Kinraide, P. Wang et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2014. – V. 15. – P. 22661-22677.
75. Zhou, D.-M. A novel approach for predicting the uptake and toxicity of metallic and metalloid ions [Text] / D.-M. Zhou, P. Wang // Plant Signaling & Behavior. – 2011. – V. 6(3). – P. 461-465.

76. Kinraide, T. B. Three Mechanisms for the Calcium Alleviation of Mineral Toxicities [Text] / T. B. Kinraide // Plant Physiology. – 1998. – V. 118. – P. 513-520.

77. Физиология растений: учебник для студ. вузов /Н. Д. Алехина, Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко и др.; Под.ред. И. П. Ермакова. – М.: «Академия», 2005. – 640 с.

78. Fromm, J. Electrical signals and their physiological significance in plants [Text] / J. Fromm, S. Lautner // Plant, Cell and Environment. – 2007. – V. 30. – P. 249–257.

79. Action potentials in a giant algal cell: a comparative approach to mechanisms and evolution of excitability [Text] / B. R. Johnson, R. A. Wyttenbach, R. Wayne et al. // The Journal of Undergraduate Neuroscience Education. – 2002. – V. 1. – P. 23-27.

80. Pickard, B. G. Action potentials in higher plants [Text] / B. G. Pickard // The botanical review. – 1979. – V. 39. – № 2. – P. 172-201.

81. Лукоянычева, О. В. Анализ измерений биоэлектрических потенциалов [Текст] / О. В. Лукоянычева // Ползуновский альманах. – 2012. – № 2. – С. 167-170.

82. Воденеев, В. А. Механизмы генерации и функциональная роль потенциалов возбуждения у высших растений: автореф. дис. ... д. биол. наук: 03.00.12, 03.00.02 / В. А. Воденеев. – Москва, 2009. – 42 с.

83. Феномен отрицательной температурной зависимости адаптивной реполяризации клеток высшего растения при охлаждении [Текст] / С. С. Пятыгин, В. М. Треушников, В. А. Оприлов и др. // Физиология растений. – 1996. – Т. 43. – № 1. – С. 80–86.

84. Пятыгин, С. С. Биоэлектрическая компонента синдрома адаптации у высших растений [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.unn.ru/pages/e-library/vestnik/9999-0191_West_bio_2001/6.pdf (05.01.2015)

85. Биоэлектрическая активность клеток высшего растения при химическом стресс-воздействии [Текст] / С. С. Пятыгин, В. А. Оприлов., В. О. Крауз и др. // Вестник Нижегородского университета имени Н.И. Лобачевского. Биофизика. – 1999. – № 1. – С. 119-123.

86. Ретивин, В. Г. Преадаптация тканей стебля *Cucurbita pepo* L. к повреждающему действию низких температур, индуцированная потенциалом действия [Текст] / В. Г. Ретивин, В. А. Оприлов, С. Б. Федулina // Физиология растений. – 1997. – Т. 44. – № 4. – С. 499-510.

87. Гайдукова, С. Е. Разработка системы генетической трансформации ряски малой (*Lemna minor* L.): аттореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06/ С. Е. Гайдукова. – Москва, 2011. – 18 с.

88. Löppert, H. Energy coupling for membrane hyperpolarization in *Lemna*: evidence against an ATP-fueled electrogenic pump as the exclusive mechanism [Text] / H. Löppert // Planta. – 1981. – V. 151. – P. 293-297.

89. Löppert, H. Energy coupling for membrane hyperpolarization in *Lemna*: respiration rate, ATP level and membrane potential at low oxygen concentrations [Text] / H. Löppert // Planta. – 1983. – V. 159. – P. 329-335.

90. Löppert, H. Phytochrome-mediated changes in the membrane potential of subepidermal cells of *Lemna paucicostata* 6746 [Text] / H. Löppert, W. Kronberger, R. Kandeler // Planta. – 1978. – V. 138. – P. 133-136.

91. Löppert, H. Evidence for electrogenic proton extrusion by subepidermal cells of *Lemna paucicostata* 6746 [Text] / H. Löppert // Planta. – 1979. – V. 144. – P. 311-315.

92. Novacky, A. Membrane potential changes during transport of hexoses in *Lemna gibba* G1 [Text] / A. Novacky, C. I. Ullrich-Eberius, U. Lüttge // Planta. – 1978. – V. 138. – P. 263-270.

93. Novacky, A. Membrane potential changes during transport of glycine as a neutral amino acid and nitrate in *Lemna gibba* G 1 [Text] / A. Novacky, E. Fischer // FEBS Letters. – 1978. – V. 88. – № 2. – P. 264-267.

94. Fischer, E. Membrane potential changes related to active transport of glycine in *Lemna gibba* G1 [Text] / E. Fischer, U. Lüttge // Plant Physiology. – 1980. – V. 65. – P. 1004-1008.
95. Basso, B. Membrane potential and proton cotransport of alanine and phosphate as affected by permeant weak acids in *Lemna gibba* [Text] / B. Basso, C. I. Ullrich-Eberius // Plant Physiology. – 1987. – V. 85. – P. 674-678.
96. Sanz, A. Uptake of acidic and basic sugar derivatives in *Lemna gibba* G1 [Text] / A. Sanz, C. I. Ullrich // Plant Physiology. – 1989. – V. 90. – P. 1532-1537.
97. Effect of abscisic acid on membrane potential and transport of glucose and glycine in *Lemna gibba* G1 [Text] / W. Hartung., C. I. Ullrich-Eberius, U. Lüttge et al. // Planta. – 1980. – V. 148. – P. 256-261.
98. Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1 [Text] / C. I. Ullrich-Eberius, A. Novacky, E. Fischer et al. // Plant Physiology. – 1981. – V. 67. – P. 797-801.
99. Луппа, Х. Основы гистохимии [Текст] / Х. Луппа. – М. : Изд-во «Мир», 1980. – 344 с.
100. Гистохимия Пущинский Госуниверситет Учебное пособие [электронный ресурс] – Режим доступа: <http://himsnab-spb.ru/article/mag/histochemistry/> (15.02.2015)
101. Пирс, Э. Гистохимия [Текст] / Э. Пирс. – М. : Изд-во иностр. лит. 1962, – 964 с.
102. Hassan, E. A Brief review on the application of histochemical methods in different aspects of plant research [Text] / E. A Hassan and M. E. El-Awadi // Nature and Science. – 2013. – № 11(12). – P. 54-67.
103. Бакланов, И. А. Накопление, распределение и действие никеля на растения-гипераккумуляторы и исключатели из рода *Alyssum* [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05 / И. А. Бакланов. – Москва, 2011. – 24 с.

104. Серегин, И. В. Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост растений [Текст] : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 03.00.12 / И. В. Серегин. – Москва, 2009. – 53 с.

105. Studies on spatial distribution of nickel in leaves and stems of the metal hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* using nuclear microprobe (micro-PIXE) and EDXS techniques [Text] / N. Bhatia, K. Walsh, I. Orlic et al. // Functional plant biology. – 2004. – № 31. – P. 1061-1074.

106. Пожванов, Г. А. Метод количественной оценки содержания ауксина по гистохимическому окрашиванию на активность GUS под контролем ауксин-чувствительного промотора [Текст] / Г. А. Пожванов, С. С. Медведев // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – № 5. – С. 786-792.

107. Gramlich, A. Development of a semi-quantitative method to determine the distribution of Ni in hyperaccumulator plants [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:30274/eth-30274-01.pdf> (15.02.15)

108. Dimethylglyoxime (DMG) staining for semi-quantitative mapping of Ni in plant tissue [Text] / A. Gramlich, A. B. Moradi, Brett H. Robinson, et. al. // Environmental and Experimental Botany. – 2011. – V. 71. – P. 232-240.

109. Серегин, И. В. Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях [Текст] / И. В. Серегин, В. Б. Иванов // Физиология растений. – 1997. – Т. 44. – С. 915- 921.

110. Серегин, И. В. Гистохимические методы определения локализации тяжелых металлов и стронция в тканях высших растений [Текст] / И. В. Серегин, А. Д. Кожевникова // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – № 4. – С. 617-623.

111. Прохорова, Н. В. Гистохимический анализ в оценке эколого-биогеохимических характеристик агрофитоценозов [Текст] / Н. В. Прохорова, Ю. В. Макарова // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2006. – № 7. – С. 177-185.

112. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) [Text] / P. Vollenweider, C. Cosio, M. S. Günthardt-Goerg et al. // Environmental and Experimental Botany. – 2006. – V. 58. – P. 25–40

113. Макарова, Ю. В. Распределение цинка, меди и кадмия в корневой системе фасоли обыкновенной в условиях разных сред произрастания [Текст] / Ю. В. Макарова // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2010. – № 6. – С. 217-225.

114. Макарова, Ю. В. Гистохимическая оценка накопления и распределения тяжелых металлов в органах и тканях сельскохозяйственных растений в зависимости от условий произрастания [Текст] :автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Ю. В. Макарова. – Тольятти, 2006. – 19 с.

115. Baklanov, I. A. Histochemical analysis of nickel distribution in the hyperaccumulator and excluder in the genus *Alyssum* L. [Text] / I. A. Baklanov, I. V. Seregin, V. B. Ivanov // Doklady Biological Sciences. – 2009. – V. 429. – № 1. – P. 548-550.

116. Серегин, И. В. Транспорт, распределение и токсическое действие стронция на рост проростков кукурузы [Текст] / И. В. Серегин, Л. Д. Кожевникова // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – С. 241-248.

117. Кузнецова, Е. А. Использование комплексонов хиназолил-формазанового ряда для идентификации ионов Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} в семенах растений [Текст] / Е. А. Кузнецова // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч. 6. – С. 1266-1270.

118. Рогулева, Н. О. Некоторые особенности накопления тяжелых металлов почвами и растениями парков г. Самары [Текст] / Н. О. Рогулева // Вопросы современной науки и практики. – 2007. – № 4(10). – Т. 1. – С. 23-27.

119. Еремченко, О. З. Микроэлементный состав почв и растительности заповедной лесостепи в условиях техногенеза [Электронный ресурс] / О. З. Еремченко, Л. А. Чудинова // – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/pdf/2012/5/162.pdf> (14.02.2015)

120. Бакланов, И. А. Накопление, распределение и действие никеля на растения-гипераккумуляторы и исключатели из рода *Alyssum* [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05 / И. А. Бакланов. – Москва, 2011. – 24 с.
121. Маджугина, Ю. Г. Исследование способности вейника наземного аккумулировать тяжелые металлы с целью разработки технологии фиторемедиации [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.12 / Ю. Г. Маджугина. – Москва, 2008. – 25 с.
122. Щудло, М. М. Количественный анализ метакромазии суставного хряща в телепатологии [Текст] / М. М. Щудло, Т. А. Ступина, Н. А. Щудло // Известия Челябинского научного центра. – 2004. – Т. 25. – С. 17-22.
123. Startseva, M. S. Quantification of intensity of histochemical and immunohistochemical responses using standard computer software [Text] / M. S. Startseva, V. M. Chertok // Pacific Medical Journal. – 2012. – №. 1. – P. 121–123.
124. Les, D. H. Systematics of the Lemnaceae (duckweeds): inferences from micromolecular and morphological data [Text] / D. H. Les, E. Landolt, D. J. Crawford // Plant Systematics and Evolution. – 1997. – V. 204. – P. 161-177.
125. Hoagland, D. R., The water-culture method for growing plants without soil / D. R. Hoagland, D. I. Arnon // California Agricultural Experimental Station Circular. – 1950. – V. 347. – P. 1-32.
126. Kittiwongwattanal, Ch. Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata* during in vitro and ex vitro cultivation [Text] / Ch. Kittiwongwattana¹, S. Vuttipongchaikij // Maejo International Journal of Science and Technology. – 2013. – V. 7(01). – P. 60-69.
127. Гусяков, Н. Е. Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Черного моря и прилегающих водоемов [Текст] / Н. Е. Гусяков, О. А. Закордонец, В. П. Герасимюк. – Киев, «Наукова думка», 1992. – 112 с.
128. Duckweed Anatomy: Preparation of Duckweed fronds for study. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

<http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/duckweed-anatomy-preparation.htm>

129. Dijkman, M. J. Extension of life span of *Lemna perpusilla* clone 6746 by ultraviolet radiation [Text] / J. M. Dijkman, M. L. Boss, E. R. Russell // Radiation Research. – 1964. – V. 22. – P. 662-667.

130. Wangermann, E. Some effects of ultraviolet radiation on *Lemna minor* [Text] / E. Wangermann, H. J. Lacey // Nature. – 1952. – V. 170. – P. 126-127.

131. Kawashima, Sh. An Algorithm for Estimating Chlorophyll Content in Leaves Using a Video Camera [Text] // Sh. Kawashima, M. Nakatani // Annals of Botany. – 1998. – № 81. – P. 49-54

132. Keeping an eye on the carbon balance: linking canopy development and net ecosystem exchange using a webcam [Text] / L. Wingate, A. D. Richardson, J. F. Weltzin et al. // FluxLetter. – 2005. – V. 1. – № 2. – P. 14-17

133. Use of digital webcam images to track spring green-up in a deciduous broadleaf forest [Text] / A. D. Richardson, J. P. Jenkins, B. H. Braswel et al. // Oecologia. – 2007. – V. 152. – № 2. – P. 323-334

134. Measuring Leaf Chlorophyll Concentration from Its Color: A Way in Monitoring Environment Change to Plantations [Text] / M. A. H. Shibghatallah, S. N. Khotimah, S. Suhandono // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://arxiv.org/pdf/1305.1148v2.pdf>

135. Padmaja, V. Evaluation of leaf chlorophyll content by a non-invasive approach [Text] / V. Padmaja, A. K. Dey // International journal of innovative research in electrical, electronics, instrumentation and control engineering. – 2015. – V. 3. – № 7. – P. 7-10

136. Хейфец, Л. Я. Возможности и перспективы использования вольтамперометрии в анализе и очистке природных и сточных вод [Текст] / Л. Я. Хейфец, А. Е. Васюков // Журнал аналитической химии. – 1999. – Т. 54, № 5. – С. 431-436.

137. Электроаналитические методы в контроле окружающей среды [Текст] / Р. Кальвода, Я. Зыка, К. Штулик и др.; Пер. с англ. Е.Я. Неймана. – М.: Химия, 1990. – 240 с.

138. Брайнина, Х. З. Инверсионные электроаналитические методы [Текст] / Х. З. Брайнина, Е. Я. Нейман. – М.: Химия, 1988. – 239 с.
139. Массовая концентрация никеля в водах. Методика выполнения измерений фотометрическим методом с диметилглиоксимом. РД 52.24.494-2006"(утв. Росгидрометом 24.04.2006)
140. Hammer, Ø. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis [Text] / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // *Palaeontologia Electronica*. – 2001. – V. 4. – № 1. – P. 1-9.
141. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. [Текст] / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
142. Урбах, В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях [Текст] / В. Ю. Урбах. – М.: Медицина, 1975. – 297 с.
143. Макарова, Н. В. Статистика в Excel [Текст] / Н. В. Макарова, В. Я. Трофимец. – М.: Финансы и статистика, 2002. – 368 с.
144. Гайдышев, И. Анализ и обработка данных: специальный справочник [Текст] / И. Гайдышев. – СПб: Питер, 2001. – 752 с.
145. Кобзарь, А. И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников [Текст] / А. И. Кобзарь. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006. – 816 с.
146. Тяжелые металлы [электронный ресурс] – режим доступа: <http://biology.krc.karelia.ru/misc/hydro/mon5.html>
147. Observation Parameters of the Duckweed Growth Inhibition Test Frond number - Total Frond Area - Dry weight [Электронный ресурс] – Режим доступа: www.Lemnatec.com/Literatur/LT001.pdf
148. Aljabysheva, E. A. Change of morfofiziologicheskyy parameters at *Lemna minor* L. at pollution of city reservoirs / E. A. Aljabysheva [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.sworld.com.ua/konfer30/532.pdf>

149. The rhizotoxicity of metal cations is related to their strength of binding to hard ligands [Text] / P. M. Kopittke, N. W. Menzies, P. Wang et al. // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2014. – V. 33. – № 2. – P. 268-277.

150. Kinraide, T. B. Improved scales for metal ion softness and toxicity [Text] / T. B. Kinraide // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2009. – V. 28. – № 3. – P. 525-533.

151. Kinraide, T. B. A scale of metal ions binding strengths correlating with ionic charge, Pauling electronegativity, toxicity, and other physiological effects [Text] / T. B. Kinraide, U. Yermiyahu // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2007. – V. 101. – P. 1201-1213.

152. Ownby, D. R. Advanced in quantitative ion character-activity relationships (QICARs): using metal-ligand binding characteristics to predict metal toxicity [Text] / D. R. Ownby, M. C. Newman // *Quantitative Structure-activity Relationships*. – 2003. – V. 22. – P. 1-6.

153. McCloskey, J. T. Predicting the relative toxicity of metal ions using ion characteristics: Microtox[®] bioluminescence assay [Text] / J. T. McCloskey, M. C. Newman, S. B. Clark // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 1996, – V. 15. – № 10. – P. 1730-1737.

154. Рубин, А. Б. Биофизика: учебник для биологических спец. вузов : в 2 т. [Текст] / А. Б. Рубин. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : Университет, 1999 – 2000.

155. Szerdahelyi, P. A Highly sensitive method for the histochemical demonstration of copper in normal rat tissues [Text] / P. A. Szerdahelyi, P. Kása // *Histochemistry*. – 1986. – V. 85. – P. 349-352

156. Histochemical demonstration of copper and copper-associated protein in the canine liver [Text] / L. P. Thornburg, M. Beissenherz, M. Dola et al. // *Veterinary Pathology*. – 1985. – V. 22. – P. 327-332.

157. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с болезнью Вильсона у детей. – 2013,

[электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.pediatrics.ru/sites/default/files/kr_wilson.pdf

158. ГОСТ 4388-72 Вода питьевая. Методы определения массовой концентрации меди

159. ПНД Ф 14.1;2.48-96 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации ионов меди в природных и сточных водах

160. О возможности применения диэтилдитиокарбамата натрия в качестве потенциометрического реагента [Текст]/ Р. А. Терентьев, В. К. Чеботарев, Е. Г. Ильина и др. // Известия Алтайского государственного университета. Химия. – 2011. – 3-2(71). – С. 163-167

161. Valiev, R. Sh. Using of histochemical methods for quality evaluation of contamination of natural water bodies with some heavy metals [Text] / R. Sh. Valiev, L. N. Olshanskaja/ Das internationale Symposium "Oekologische, technologische und rechtliche Aspekte der Lebensversorgung" (Euro-Eco) - Hannover, 28-29 November. 2013. – Hannover: EWG, 2013. – P. 142-143.

162. Анализ воды на медь [электронный ресурс] – Режим доступа <http://www.gicpv.ru/him39-5.htm> (03.05.2014)

163. Валиев, Р. Ш. Изучение ответных реакций ряски крошечной *Lemna perpusilla* Torr. на медь [Текст] / Р. Ш. Валиев, Л. Н. Ольшанская, Л. В. Головина // Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия: материалы III Междунар. научно-практич. конференции. Часть 5, Новосибирск. 15-16 августа 2014 г. - Новосибирск: Международный Научный Институт «Educatio», 2014. - С. 155-159.

164. Барьерная функция клеточных стенок при поглощении ионов никеля [Текст] / Н. Р. Мейчик, Ю. И. Николаева, О. В. Комарынец и др. // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – № 3. – С. 345-350

165. Мейчик, Н. Р. Ионогенные клеточных стенок корней пшеницы [Текст] / Н. Р. Мейчик, И. П. Ермакова, М. В. Савватеева // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 5. – С. 742-747

166. Мейчик, Н. Р. Ионообменные свойства клеточных стенок корней *Spinacia oleracea* L. при различных условиях засоления внешней среды [Текст] / Н. Р. Мейчик, Ю. И. Николаева, И. П. Ермаков // Физиология растений. – 2006. – Т. 71. – С. 961-971

167. Ионообменные свойства клеточных стенок у сортов нута с различной чувствительностью к засолению [Текст] / Н. Р. Мейчик, И. П. Ермаков, С. Д. Хонарманд и др. // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – № 5. – С. 665-675

168. Kwan, K.H.M. Accumulated forms of thallium and cadmium in *Lemna minor* L. Distribution in aqueous soluble and insoluble fractions / K.H.M. Kwan, S. Smith // Chemical Speciation and Bioavailability. – 1990. – № 2. – P. 77-84.

169. Реакция на соли тяжелых металлов. Рясковые - Биоиндикаторы Агроценоза [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://duckweed.kubagro.ru/heavymetal.htm> (05.04.2015).

170. Определения показателей загрязнения вод [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://geol.irk.ru/baikal/baikal/water/anno/pokaz.htm> (06.07.2015).

171. Практикум по оценке качества сточных вод на кожевенно-меховых предприятиях: Учебное пособие [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://window.edu.ru/catalog/pdf2txt/711/40711/18016?p_page=8 (06.07.2015).

172. Валиев, Р. Ш. Биоэлектрогенез ряски крошечной *Lemna perpusilla* Torr. в процессе фиторемедиации вод от солей меди [Текст] / Р. Ш. Валиев, Л. Н. Олышанская // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. – 2015. – Т. 58, вып. 3. – С. 49-53.

173. Крешков, А. П. Основы аналитической химии. В 3 т. Т. 1. [Текст] / А. П. Крешков. – М.: «Химия», 1970. – 74 с.

174. Фиторемедиационные технологии в защите гидросферы: монография / Л. Н. Олышанская, Н. А. Собгайда, Ю. А. Тарушкина и др.; под ред. Л. Н. Олышанской. – Саратов: Сарат. гос. техн. ун-та, 2011, – 136 с.

175. Effect of electromagnetic fields on duckweed (*Lemna minor*) and algae (*Chlorella kessleri*) [Text] / M. Tkalec, K. Malarić, R. Malarić et al. // Proceedings of the Sixth Symposium of the Croatian Radiation Protection Association. Zagreb, – 2005. – P. 447-453

176. Tkalec, M. Influence of 400,900, and 1900 MHz Electromagnetic Fields on *Lemna minor* Growth and Peroxidase Activity [Text] / M. Tkalec, K. Malarić, R. Malarić // Bioelectromagnetics. – 2005. – V. 26. – P. 185-193

177. Олышанская, Л. Н. Воздействие магнитного поля на процессы извлечения тяжелых металлов ряской [Текст] / Л. Н. Олышанская, Н. А. Собгайда, А. В. Стоянов // Известия ВУЗов «Химия и химическая технология». – 2010. – Т.53. – № 9. – С.87-91.

178. Häder, D.-P. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate changes [Text] / D.-P. Häder, H. D. Kumar, R. C. Smith et al. // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2007. – V. 6. – P. 267-285.

179. Wangermann, E. Experiments on *Lemna minor* with adenine, triiodobenzoic acid and ultra-violet radiation [Text] / E. Wangermann, H. J. Lacey // New Phytologist. – 1953. – P. 298-311.

180. Jansen, M. A. K. UV-B radiation: “When does the stressor cause stress?” [Text] / M. A. K. Jansen, É. Hide, F. J. C. Lidon // Emirates Journal of Food and Agriculture. – 2012. – V. 24. – P. 204-208.

181. Huan, X-D. Impacts of UV radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba* (duckweed) [Text] / X-D. Huang, D. G. Dixon, B. M. Greenberg // Environmental Toxicology and Chemistry. – 1993. – V. 12. – P. 1067-1077.

182. Duxbury, C. L. Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed *Lemna*

gibba [Text] / C. L. Duxbury, D. G. Dixon, B. M. Greenberg // Environmental Toxicology and Chemistry. – 1997. – V. 16. – № 8. – P. 1739–1748

183. Effects of artificial ultraviolet-B radiation on growth and fatty acid composition of duckweed (*Lemna minor*) [Text] / D. L. W. Young, M. D. Wiegand, N. L. Loadman et al. // Freshwater Biology. – 2006. – V. 51. – P. 2029–2040.

184. Собгайда, Н. А. Методология очистки сточных вод химических и нефтехимических отраслей промышленности фитосорбентами и модифицированными отходами агропромышленного комплекса: автореф. дис. ... докт. техн. наук : 03.02.08 / Н. А. Собгайда. – Казань, 2011. – 39 с.

185. Shiu, C.-T. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate–glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata* [Text] / C.-T. Shiu, T.-M. Lee // Journal of Experimental Botany. – 2005. – V. 56. – № 421. – P. 2851–2865.

186. Jesudian, K. Increase in membrane permeability of electrolytes and betacyanin in beet root disc by fenitrothion [Text] / K. Jesudian, S. Bosse // Journal of Biosciences. – 1982. – V. 5. – № 1. – P. 79–84.

187. Чиркова, Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям [Текст] // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 9. – С. 12–17.

188. Bajji, M. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat [Text] / M. Bajji, J.-M. Kinet, S. Lutts // Plant Growth Regulation. – 2002. – V. 36. – № 1. – P. 1–10.

189. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants [Text] / P. S. Campos, V. Quartin, J. C. Ramalho et al. // Journal of plant physiology. – 2003. – V. 160. – P. 283–292.

190. Гришенкова, Н. Н. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического

метода [Текст] / Н. Н. Гришенкова, А. С. Лукаткин // Поволжский экологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 3-11.

191. Cell Viability and Leakage of Electrolytes in *Avicennia germinans* Exposed to Heavy Metals [Text] / D. González-Mendoza, A. Quiroz-Moreno, R. E. G. Medrano et al. // Zeitschrift für Naturforschung. – 2009. – V. 64(5-6). – P. 391-394.

192. Copper Effects on Photosynthetic Activity and Membrane Leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana* [Text] / G. Sánchez-Viveros, D. González-Mendoza, A. Alarcón et al. // International Journal of Agriculture & Biology. – 2010. – V. 12. – P. 365-368.

193. Лукаткин, А. С. Влияние тидиазулона на термоустойчивость растений кукурузы [Текст] / А. С. Лукаткин, Н. Н. Каштанова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2013. – № 3. – С. 129–135.

194. Организм и среда: факториальная экология: учебное пособие [Текст] / О. Л. Воскресенская, Е. А. Скочилова, Т. И. Копылова и др. Мар. гос. ун-т. Йошкар-Ола, 2005. – 180 с.

195. Zlatko, S. Z. Plant physiological responses to UV-B radiation [Text] / S. Z. Zlatko, F. J. C. Lidon, M. Kaimakanova // Emirates Journal of Food and Agriculture. – 2012. – № 24. – P. 481-501.

196. Ikehara, T. Effects of electromagnetic fields on membrane ion transport of cultured cells [Text] / T. Ikehara, H. Yamaguchi, H. Miyamoto // The Journal of Medical Investigation. – 1998. – V. 45. – P. 47-56.

197. Валиев, Р. Ш. Регенерация рясок малой и крошечной после очистки водных сред от солей никеля и меди и смешанных растворов никели и меди с кальцием / Р. Ш. Валиев, Л. Н. Ольшанская, А. В. Зобкова // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18. – № 10. – С. 233-238.

198. Галицкая, А. А. Эколого-биохимическая адаптация *Wolffia arrhiza* L. к абиотическим и биотическим факторам среды :автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.08, 03.01.04 / А. А. Галицкая. – Саратов, 2012. – 20 с.

199. Исследование адаптации *Wolffia arrhiza* (Linnaeus, 1771) Horkel ex Wimmer к различным минеральным и биогенным поллютантам на примере тяжелых металлов и антибиотиков [Текст] / А. А. Галицкая, Н. Ю. Селиванов, О. Г. Селиванова и др. // Известия Саратовского университета. – 2012. – Т. 12. Серия Химия. Биология. Экология, вып. 1. – С. 36-41.