

УДК (576.314+ 582.521.43)628.19

Т. В. Андрусишин¹, Е. В. Костюк², В. В. Грубинко²

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТОЧНЫХ
МЕМБРАНАХ *LEMNA MINOR* ИЗ р. ЗБРУЧ КАК
ИНДИКАТОР ЗАГРЯЗНЕНИЯ ТЯЖЕЛЫМИ
МЕТАЛЛАМИ**

Приведены данные относительно формирования системы концентрических мембран в клетках *Lemna minor* из р. Збруч в условиях загрязнения воды тяжелыми металлами. Установлена корреляция между динамикой содержания в ряске тяжелых металлов и величиной радиуса ее клеток, а также степенью выраженности в клетках явления мультипликативного удвоения мембран.

Ключевые слова: вторичные концентрические мембраны, тяжелые металлы, *Lemna minor*, р. Збруч.

В условиях загрязненной окружающей среды водные растения являются как важными объектами для изучения процессов адаптации живых организмов к действию различных факторов, так и индикаторами загрязнения водоемов токсикантами, в том числе тяжелыми металлами [6, 8].

Характерными для водных растений адаптивными реакциями на негативное влияние факторов среды, в том числе на действие ионов тяжелых металлов, являются структурные изменения на клеточном уровне. В первую очередь, они происходят в клеточных мембранах, которые выполняют барьерную функцию, регулируя градиенты веществ во внешней среде и внутриклеточном содержимом [2, 3]. Ранее в лабораторных экспериментах установлено, что адаптация клеток водных растений к загрязняющим веществам (тяжелые металлы, дизельное топливо) сопровождается специфическим процессом — формированием системы вторичных концентрических мембран как структурно-функциональной защиты клеток от токсического воздействия [3, 4].

Целью настоящего исследования было выявление возможности формирования системы вторичных концентрических мембран у водных растений в условиях загрязнения воды тяжелыми металлами в естественном водоеме (реке).

Материал и методика исследований. Ряску малую *Lemna minor* L. отбирали из естественного водоема (р. Збруч, Хмельницкая обл., Украина) в июне — сентябре 2010 г.

© Т. В. Андрусишин, К. В. Костюк, В. В. Грубинко, 2015

Основными факторами экологического неблагополучия в этой реке являются: флуктуации рН воды, дефицит растворенного кислорода, седиментация взвешенных органических веществ. Река также характеризуется превышением фоновых показателей содержания в воде свинца, кобальта, никеля, кадмия, а в донных отложениях — цинка, железа, свинца, кобальта, никеля и кадмия [1].

При оценке степени биологической активности ионов металлов, как правило, учитывают их подвижные формы. Поэтому нами исследовано содержание подвижных форм Zn, Mn, Fe, Cu, Pb, Co, Ni, Cd у ряски.

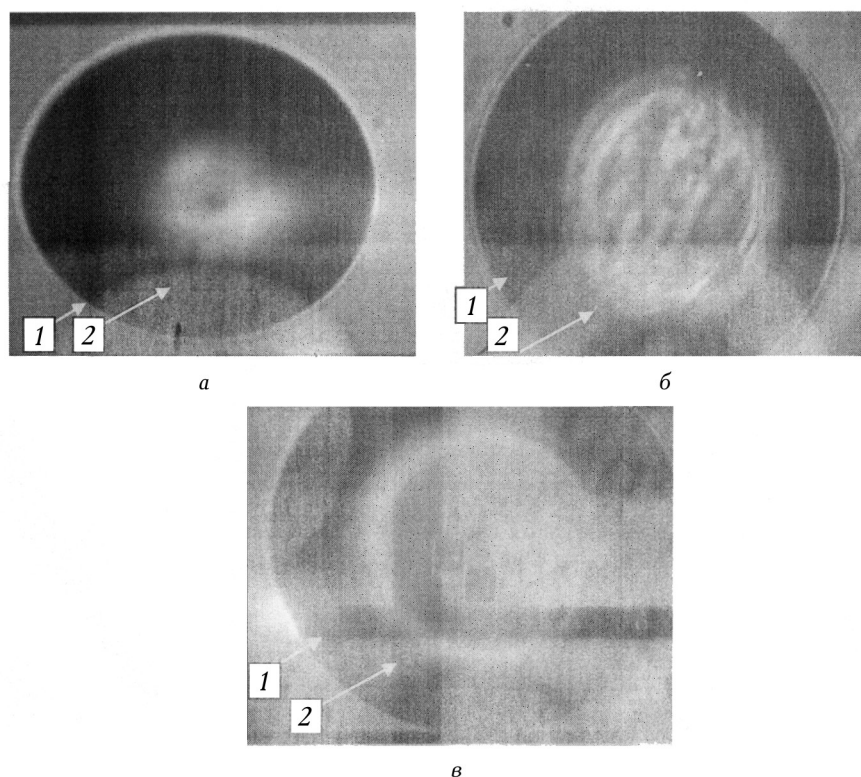
Тяжелые металлы в ряске определяли методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии на спектрофотометре С-115 при длинах волн, соответствующих максимуму поглощения каждого из исследуемых металлов, после сжигания высушенных образцов растения в HNO_3 ($1,35 \text{ г/см}^3$) с последующим окислением H_2O_2 при нагревании в течение 1 ч. Содержание металлов выражали в мг на 1 кг сухой массы исследуемых образцов.

Клеточные мембраны выделяли по методике Финдлей и Эванз [9], модифицированной авторами [3, 4]. Из гомогенатов биомассы водных растений, полученных в механическом гомогенизаторе при 7000 об/мин в 5 мМ трис-НСI буфере (рН 7,6), содержавшем 0,5 М сахарозы, 0,005 М ЭДТА, 0,01 М КСI и 0,001 М MgCl_2 (сырая масса : объем буфера — 1:5), путем центрифугирования при 5000 об/мин в течении 15 мин. получали осадок, содержащий клеточные мембраны. Последний ресуспензировали в верхней фазе раствора, полученного смешиванием р-ов 0,25 М сахарозы и 30%-ного полиэтиленгликоля в 0,2 М р-ре фосфата натрия, предварительно выдержанного 24 ч при 4°C. Суспензию распределяли поровну в три поликарбонатные пробирки объемом 50 мл, в каждую добавляли 10 мл нижней фазы смеси вышеуказанных растворов, смешивали и центрифугировали при 2000 об/мин в течении 15 мин в бакет-ротаторе. Мембранный материал отбирали на границе раздела фаз с помощью шприца. Все процедуры осуществлены при 4°C. Морфологические изменения в мембранах после их окраски «хлор-цинк-йод» реактивом фиксировали с помощью микроскопа МБИ-15, с последующим интегрирующим цифровым анализом на комплексе SSTU-camera Manual Vision SSD-color-WOYV00020 [10]. Статистическую обработку полученных данных осуществляли по [5].

Результаты исследований и их обсуждение

Согласно данным микроскопии, в клетках ряски малой *L. minor* в июне начинает образовываться концентрическая мембранная система. При этом в большинстве клеток наблюдали уменьшение объема внутриклеточного пространства за счет утолщения клеточной стенки и уплотнений по ее периферии (рисунок). В июне в клетках ряски также выявлено максимальное содержание Pb, Mn, Ni, а также высокое содержание Cu (табл. 1), что и могло стать причиной выявленных структурных изменений клеточной стенки, поскольку тяжелые металлы обладают выраженными токсичными свойствами, особенно при совместном воздействии. Выявленные внутриклеточные процессы могут быть проявлением «неспецифического адаптационного синдрома» [6].

В августе, по сравнению с июнем, в клетках ряски наблюдали утолщение вторичной мембраны, в среднем на 0,24 мкм (см. рисунок). Радиус клеток также увеличился в среднем на 1,77 мкм (табл. 2). Содержание металлов в



Формирование вторичной концентрической мембраны в клетках ряски в июне (а), августе (б) и сентябре (в); 1 — первичная мембрана; 2 — вторичная мембрана. Микрофотографии клеток *Lemna minor*, $\times 9000$.

ряске в августе было несколько ниже по сравнению с июнем, за исключением Fe.

В сентябре состояние большинства клеток характеризовалось стабилизацией ядерно-цитоплазматического пространства и ярко выраженным двойным мембранным комплексом (см. рисунок). Содержание металлов в ряске увеличилось по сравнению с августом (за исключением Mn и Ni), а содержание Fe и Zn было максимальным за весь период исследований. В сентябре в растениях также был выявлен кадмий.

Соотношение радиусов клеток до первичной и вторичной мембран составляло: в июне — 1,6, в августе — 1,5, в сентябре — 1,3, что соответствует динамике концентрации тяжелых металлов в ряске: чем выше содержание металлов, тем более ярко выражено формирование двойного мембранного комплекса и тем больше соотношение радиусов первичной и вторичной мембран. Увеличение содержания металлов за исследуемый период в клетках *L. minor* можно представить рядом: $Cd < Co < Cu < Pb < Ni < Zn < Mn < Fe$.

С использованием таблицы Чеддока [5, 8] для интерпретации результатов корреляционного анализа, установлена взаимосвязь радиуса клеток и концентрации металлов в ряске для Cu ($n = 5, r = 0,50$), Pb ($n = 5, r = 0,52$),

1. Содержание металлов у *Lemna minor* из р. Збруч, мг/кг сухой массы, $M \pm m$, $n = 5$

| Календарные сроки исследований | Металлы | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | Cu | Pb | Mn | Fe | Co | Ni | Cd | Zn |
| Июнь | 4,51 ± 0,40 | 8,50 ± 0,90 | 45,26 ± 3,90 | 59,50 ± 3,90 | 3,42 ± 0,10 | 10,47 ± 0,40 | 0 | 10,12 ± 0,70 |
| Август | 3,07 ± 0,20 | 3,60 ± 0,40 | 22,95 ± 1,90 | 84,47 ± 6,40 | 2,80 ± 0,10 | 9,94 ± 0,40 | 0 | 9,74 ± 1,10 |
| Сентябрь | 3,28 ± 0,14 | 4,96 ± 0,24 | 6,76 ± 0,71 | 90,00 ± 11,70 | 3,28 ± 0,20 | 7,69 ± 0,50 | 0,49 ± 0,10 | 10,90 ± 0,80 |

2. Основные морфометрические параметры клеток *Lemna minor*, мкм, $n = 5$

| Параметры клеток | Июнь | Август | Сентябрь |
|------------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>R</i> | 5,40 ± 0,35 | 7,17 ± 0,64 | 3,57 ± 0,42 |
| <i>M1</i> | 2,54 ± 0,29 | 3,15 ± 0,38 | 2,05 ± 0,27 |
| <i>M2</i> | 1,62 ± 0,21 | 1,85 ± 0,26 | 1,77 ± 0,22 |

Примечание. *R* — радиус клетки; *M1* и *M2* — соответственно толщина внешней (первичной) и внутренней (вторичной) мембран.

Со ($n = 5, r = 0,57$) и Zn ($n = 5, r = 0,53$). Связь с содержанием железа отсутствует, а с Ni — слабая. Что касается взаимосвязи толщины вторичной мембраны с содержанием металлов, то установлена корреляция для Cu, Pb и Co (соответственно $r = 0,47$ и $0,56$), слабая — для Mn, Ni и Zn (соответственно $r = 0,37, 0,44$ и $0,47$). Необходимо отметить, что в работе определяли средние показатели по выборке с учетом влияния на растения конкретного металла, но не учитывались возможные следствия их совместного действия.

Результаты исследования подтверждают тот факт, что у ряски в естественных условиях, так же как и в лабораторных экспериментах, воздействие тяжелых металлов вызывает формирование в клетках системы вторичных концентрических мембран. В условиях естественного водоема трудно установить связь между динамикой концентрации металлов в растении и процессом формирования концентрических мембран без учета совместного влияния металлов, характера их взаимодействия, а также воздействия других внешних факторов. Выявленные морфометрические изменения параметров клеток, скорее всего, являются следствием совместного токсического действия металлов.

Заключение

Таким образом, степень сформированности двойной концентрической мембранной системы у *L. minor* зависит от содержания в ряске тяжелых металлов, и скорее всего определяется их совместным воздействием. Сопоставляя эти данные с динамикой содержания тяжелых металлов в воде и донных отложениях [7], выявленную закономерность можно объяснить активным поглощением металлов исследованным растением. Выявленный эффект может быть использован для ка-

чественной оценки риска от загрязнения водоемов тяжелыми металлами для водных растений.

**

*Наведено дані щодо формування системи вторинних концентричних мембран в клітинах *Lemna minor* L. з р. Збруч в умовах забруднення води важкими металами. Встановлена кореляція між динамікою вмісту в рясці важких металів і величиною радіусу її клітин, а також вираженістю розвитку в клітинах явища мультиплікативного подвоєння мембран.*

**

*The systems over of double concentric membranes given in relation to forming are brought in the cages of *Lemna minor* L. from river Zbruch is in the conditions of complex contamination of water by heavy metals. The set correlation is between the dynamics of maintenance in the duckweed of heavy metals and size of radius of her cages, and also expressed of development in the cages of the phenomenon of the multiplicative doubling of membranes.*

**

1. Андрусин Т. В., Грубінко В. В. Сезонна динаміка вмісту важких металів у воді та донних відкладах річки Збруч // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. — 2012. — Вип. 58. — С. 165—174.
2. Брагина Н.А. Мембранология. Учебно-методическое пособие. — М.: ИПЦ МИТХТ, 2002. — 98 с.
3. Костюк К. В. Структурно-функціональна реакція клітин водних рослин на дію токсикантів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2011. — 24 с.
4. Грубінко В.В., Костюк К.В. Структурные изменения в клеточных мембранах водных растений при воздействии токсических веществ // Гидробиол. журн. — 2011. — Т. 47, № 6. — С. 43—58.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
6. Растение и стресс. Курс лекций / Урал. гос. ун-т. — Екатеринбург, 2008. — 267 с.
7. Сорока Т.В. Вміст важких металів в абіотичних компонентах р. Збруч восени // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. Спец. вип.: Гідроекологія. — 2010. — Вип. 2(43). — С. 463—467.
8. Устойчивость растений к тяжелым металлам / Отв. ред. Н.Н. Немова. — Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 2007. — 172 с.
9. Финглей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ. — М.: Мир, 1990. — 423 с.
10. Broda B. Metody histochemii roslinnej. — Warszawa: Panstwowy zaklad wydawnictw lekarskich, 1971. — 255 p.

¹ Национальный медицинский университет, Киев

² Тернопольский национальный педагогический университет