

МАРИЯ НИКОЛАЕВНА КИСЛИЦИНА

инженер кафедры физиологии и биохимии растений Института естественных наук, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина (Екатеринбург, Российская Федерация)

mariyakislisina@yandex.ru

ГАЛИНА ГРИГОРЬЕВНА БОРИСОВА

доктор географических наук, профессор кафедры физиологии и биохимии растений Института естественных наук, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина (Екатеринбург, Российская Федерация)

borisova59@mail.ru

## ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ *LEMNA MINOR* L. НА ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

В модельных системах изучены морфофизиологические реакции плавающего макрофита *Lemma minor* L. (ряска малая) на действие экзогенных фенольных соединений. Растения культивировали в течение 20 суток на водопроводной воде при естественном освещении и комнатной температуре. В опытные сосуды добавляли гидрохинон и резорцин (1 и 10 мг/л). Контролем служили растения, инкубированные в воде без добавления поллютантов. Ответные реакции ряски на действие фенолов изучали путем оценки степени депигментации листецов (в динамике) и измерения площади проекции клеток мезофилла и эпидермиса, а также хлоропластов (по окончании инкубирования). Показано, что степень депигментации листецов *L. minor* зависела от вида поллютанта, его концентрации и времени экспозиции с фенолами. Гидрохинон вызывал более значительную степень повреждения листецов по сравнению с контролем и резорцином. Клетки мезофилла у *L. minor*, инкубированной в среде с резорцином, отличались меньшими размерами по сравнению с контрольным вариантом. Гидрохинон существенного влияния на площадь проекции клеток мезофилла не оказал. Размеры эпидермальных клеток в присутствии резорцина (10 мг/л) уменьшались по сравнению с контролем, а их количество возрастало (по сравнению с гидрохиноном). В присутствии гидрохинона (1 и 10 мг/л) размеры клеток увеличивались (в среднем на 20 % по сравнению с контролем). Площадь проекции хлоропластов под действием гидрохинона и резорцина уменьшалась, причем в наибольшей степени – при концентрации 10 мг/л. На основе полученных результатов сделан вывод о возможности использования ряски малой в качестве тест-объекта при оценке токсичности загрязненных фенольными соединениями сточных вод.

Ключевые слова: гидрохинон, резорцин, токсичность, *Lemma minor* L., депигментация, размеры клеток и хлоропластов, биотестирование сточных вод

В числе компонентов сточных вод и твердых отходов различных производств особую опасность из-за широкой распространенности, токсичности и трудности очистки представляют фенолы [9]. Фенольные соединения (ФС) обладают ярко выраженной биологической активностью, характер которой определяется особенностями химической структуры фенолов и продуктов их окисления, большинство из которых токсично. В условиях существенного роста антропогенных нагрузок на гидроэкосистемы все большую актуальность получают исследования, направленные на оценку влияния наиболее часто встречающихся токсикантов, в том числе фенольных соединений, на водные организмы.

К настоящему времени доказано, что в присутствии экзогенных фенолов нарушается рост растений, в клетках растений происходят изме-

нения морфологических и физиолого-биохимических показателей [1], [4], [12], [13], [14], [15]. Однако влияние ФС на мезоструктуру фотосинтетического аппарата водных макрофитов изучено слабо. Между тем именно ассимиляционный аппарат обеспечивает жизнедеятельность растений в различных экологических условиях и в значительной степени определяет биологическую продуктивность гидроценозов.

В связи с этим цель данной работы – оценка влияния экзогенных дифенолов (на примере гидрохинона и резорцина) на морфофизиологические характеристики *Lemma minor*, обеспечивающие осуществление ассимиляционного процесса.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – свободно плавающий макрофит *Lemma minor* L. (ряска малая). Растения

культивировали в течение 20 суток в модельных системах при естественном освещении и комнатной температуре на водопроводной воде. В опытные сосуды добавляли гидрохинон и резорцин (1 и 10 мг/л). Контролем служили растения, инкубированные в воде без добавления поллютантов. Для каждого варианта опыта использовали по 30 листьев (фрондов) ряски.

Определение показателей мезоструктуры проводили на растительном материале, фиксированном в 3,5 % растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 7,2) согласно методике А. Т. Мокроносова и Р. А. Борзенковой [8]. Для подсчета размеров клеток и хлоропластов проводили мацерацию листьев ряски.

Определение площади депигментации листьев осуществляли с помощью компьютерной программы обработки изображений «Контур-Шейд» [7]. Для этого анализировали фотографии, сделанные с одного и того же расстояния. На каждой фотографии присутствовал эталон с известной площадью, по которой можно определить площадь другого объекта. Измерение площади проекции хлоропластов осуществляли с помощью программного обеспечения Siams Mesoplant. Число повторностей для измерения каждого показателя было не менее 30.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel 2007 и Statistica 8,0. Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни при уровне значимости  $p < 0,05$ . На рисунках представлены средние арифметические значения показателей и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что для фотосинтетического аппарата растений характерна достаточно высокая чувствительность к воздействию неблагоприятных факторов [2]. Для оценки влияния фенолов на состояние пигментного комплекса ряски малой была изучена динамика изменения площади депигментации листьев при инкубировании в модельных системах с добавлением ФС (рис. 1 и 2). Показано, что степень депигментации листьев *L. minor* зависела от вида поллютанта, его концентрации и времени экспозиции.

Добавление резорцина (1 и 10 мг/л) не приводило к значительному увеличению площади депигментации листьев по сравнению с контролем. На 20-й день экспозиции были отмечены сопоставимые признаки хлороза в контрольном и опытных вариантах с резорцином. Хлороз выражался в появлении желтых и белых пятен, что, вероятно, связано с естественным старением отдельных материнских листьев. Гидрохинон

вызывал более значительное изменение окраски листьев ряски, особенно при концентрации 10 мг/л: степень депигментации при данной концентрации была в 2,6 раза выше по сравнению с контролем. По-видимому, уменьшение количества фотосинтетических пигментов у ряски в присутствии ФС можно объяснить как их деградацией, так и ингибированием синтеза в результате активации процессов свободнорадикального окисления.

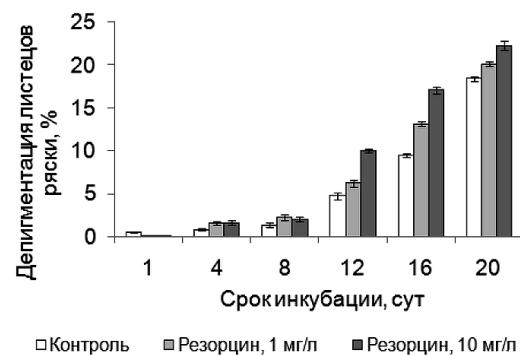


Рис. 1. Площадь депигментации листьев *L. minor* при инкубировании с резорцином

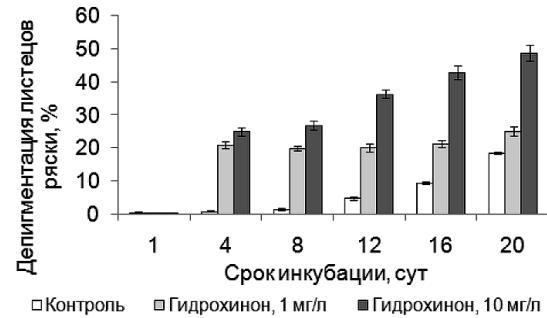


Рис. 2. Площадь депигментации листьев *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что среди двухатомных фенолов именно гидрохинон, а также пирокатехин являются наиболее токсичными для высших водных растений [5], [6], [9]. Механизм высокой токсичности гидрохинона и пирокатехина связан с окислением данных соединений с образованием высокореакционных промежуточных продуктов, в частности бензохинонов [9], [14]. Резорцин не способен образовывать хиноны, а его окисление приводит к сложной смеси продуктов с образованием ацетатов и производных пироноградной кислоты [5]. Вероятно, резорцин не оказал существенного влияния на степень депигментации листьев ряски по сравнению с контролем в силу особенностей его биохимического окисления.

Для оценки влияния ФС на клеточный аппарат ряски малой были проведены измерения площади проекции клеток мезофилла и эпидермиса. Показано, что клетки мезофилла у *L. minor*, инкубированной в среде с резорцином, отличались меньшими размерами (на 17–22 %) по сравнению с контрольным вариантом (рис. 3). Достоверных отличий от контроля в вариантах с гидрохиноном обнаружено не было. Однако при исследовании площади проекции эпидермальных клеток *L. minor* выявлено, что в присутствии гидрохинона (1 и 10 мг/л) размеры клеток увеличивались по сравнению с контролем на 17 и 23 % соответственно (рис. 4).

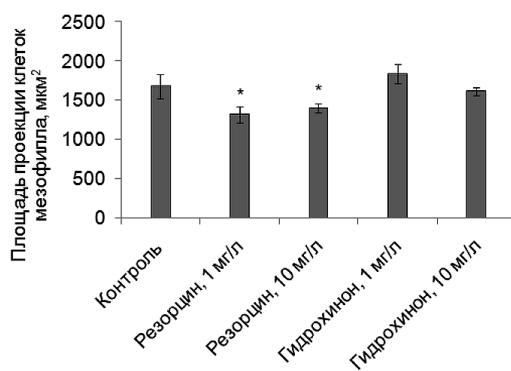


Рис. 3. Площадь проекции клеток мезофилла *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином.

\* – различия с контролем достоверны при уровне значимости  $p < 0,05$

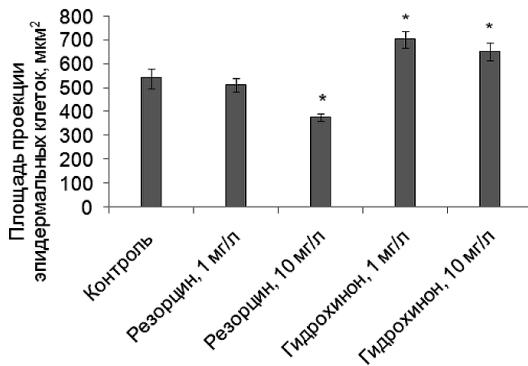


Рис. 4. Площадь проекции клеток эпидермиса *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином.

\* – различия с контролем достоверны при уровне значимости  $p < 0,05$

Эффект увеличения размеров клеток растений в ответ на загрязнение окружающей среды был обнаружен во многих исследованиях [1], [3], [10]. Вероятно, это является неспецифической реакцией, характерной как для водных, так и для наземных растений. Увеличение размеров эпидермальных клеток в присутствии гидрохинона, по-видимому, связано с интенсификацией процесса вакуолизации. Известно, что воздействие

некоторых экзогенных ФС индуцирует в клетках растений защитные механизмы, связанные со слиянием вакуолей малых размеров и образованием из них более крупных органелл, которые занимают большое внутриклеточное пространство [4]. Возрастание объема вакуоли приводит к растяжению и самой клетки. Процесс депонирования трансформированных экзогенных фенолов в вакуолях позволяет клетке существенно уменьшить их токсический эффект.

Под действием резорцина (10 мг/л) площадь проекции эпидермальных клеток уменьшалась на 30 %, в то время как его пониженная концентрация (1 мг/л) влияния на размеры клеток эпидермиса не оказала (см. рис. 4).

Таким образом, односторонних тенденций в отношении влияния исследованных ФС на параметры клеток мезофилла и эпидермиса ряски не выявлено. Более отчетливо выраженные различия между вариантами по размерам эпидермальных клеток, вероятно, можно объяснить тем, что клетки эпидермиса, находясь в непосредственном контакте с фенолами, испытывали большее воздействие по сравнению с клетками мезофилла.

Несмотря на общее снижение площади проекции эпидермальных клеток под действием резорцина (10 мг/л), число клеток на единицу площади листецов было больше в среднем на 60 % по сравнению с вариантами, в которых ряска подвергалась действию гидрохинона. Очевидно, что в вариантах с резорцином увеличение поверхности листецов ряски происходило преимущественно за счет деления клеток, а в вариантах с гидрохиноном – за счет их растяжения.

Для оценки влияния ФС на размеры хлоропластов у ряски малой была определена площадь их проекции (рис. 5). Из полученных данных видно, что гидрохинон и резорцин оказывали

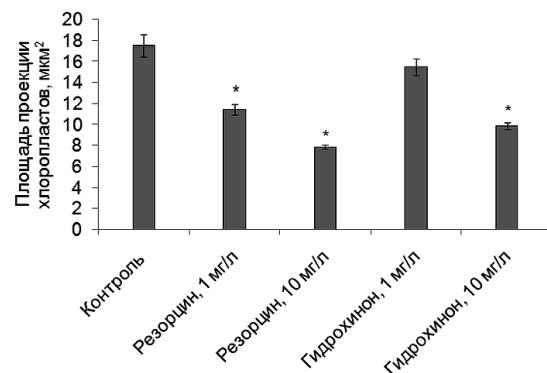


Рис. 5. Площадь проекции хлоропластов *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином.

\* – различия с контролем достоверны при уровне значимости  $p < 0,05$

отрицательное влияние на фотосинтетический аппарат: в их присутствии площадь проекции хлоропластов уменьшалась на 11–55 %. Наиболее отчетливо этот эффект наблюдался в присутствии ФС при концентрации 10 мг/л.

Анализ морфофизиологических показателей ряски малой продемонстрировал, что реакция растений на присутствие ФС была отчетливо выраженной и заключалась в изменении показателей роста, жизнеспособности, окраски листецов, размеров клеток и хлоропластов. Это позволяет рекомендовать использование ряски малой для решения задач биологического мониторинга. Ранее было предложено использовать данный вид для тестирования воды на загрязнение тяжелыми металлами и пестицидами [11]. На наш взгляд, ряска может использоваться как удобный тест-объект при оценке токсичности загрязненных фенолами сточных вод, поскольку при действии ФС, особенно гидрохинона, происходили видимые нарушения в процессах жизнедеятельности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют об отчетливо выраженном влиянии экзогенных фе-

нольных соединений на пигментный аппарат и мезоструктуру фотосинтетического аппарата ряски малой, что отражалось на степени депигментации листецов и размерах клеток и хлоропластов. Изменения в структурно-функциональной организации водных растений можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию, направленную на повышение устойчивости к действию фенолов.

Различные проявления действия дифенолов на морфофизиологические характеристики растений в значительной степени определяются типом поллютанта и могут варьироваться на фоне разных концентраций фенолов. Для изученных макрофитов гидрохинон оказался более токсичным по сравнению с резорцином, что проявилось в максимальной степени повреждения листецов ряски.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ряски малой при биотестировании загрязненных фенолами сточных вод. При оценке токсичности сточных вод наиболее информативным и наименее трудоемким в исполнении следует считать метод учета депигментации листецов ряски.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисова Г. Г., Кислицина М. Н., Чукина Н. В. Исследование токсического действия фенольных соединений на водные растения // Водное хозяйство России. 2010. № 4. С. 94–103.
2. Гетко Н. В. Растения в техногенной среде: структура и функции ассимиляционного аппарата. Минск: Наука и техника, 1989. 208 с.
3. Капитонова О. А. Особенности анатомического строения вегетативных органов некоторых видов макрофитов в условиях промышленного загрязнения среды // Экология. 2002. № 1. С. 64–66.
4. Квеситадзе Г. И., Хатисашвили Г. А., Садунисвили Т. А., Евстигнеева З. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. 198 с.
5. Кирсо У. Э., Стом Д. И., Белых Л. И., Ирха Н. И. Превращение канцерогенных и токсических веществ в гидросфере. Таллин: Валгус, 1988. 271 с.
6. Кислицина М. Н., Борисова Г. Г. Влияние гидрохинона и резорцина на морфометрические характеристики *Elodea canadensis* Michx. и *Potamogeton perfoliatus* L. // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: Сб. материалов IX Международного симпозиума. М.: ИФР РАН, 2015. С. 292–295.
7. Кислицина М. Н., Еремеев М. С. Программа расчета площади объектов на плоскости «Контур-Шейд». Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2015662124. Заявка № 2015618128 от 01.09.2015. Зарег. 17.11.2015.
8. Мокроносов А. Т., Борзенкова Р. А. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1978. Т. 61. С. 119–133.
9. Стом Д. И. Фитотоксичность и механизм детоксикации фенолов водными растениями: Автореф. д-ра биол. наук. Киев, 1982. 48 с.
10. Чукина Н. В., Борисова Г. Г. Структурно-функциональные показатели высших водных растений из местообитаний с разным уровнем антропогенного воздействия // Биология внутренних вод. 2010. № 1. С. 49–56.
11. Цаценко Л. В., Малюга Н. Г. Чувствительность различных тестов на загрязнение вод тяжелыми металлами и пестицидами с использованием ряски малой *Lemna minor* L. // Экология. 1998. № 5. С. 407–409.
12. Park J. S., Brown M. T., Han T. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata* // Aquatic Toxicology. 2012. Vol. 106–107. P. 182–188.
13. Scragg A. H. The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella VT-1* // Enzyme and Microbial Technology. 2006. Vol. 39. P. 796–799.
14. Stom D. I. Influence of polyphenols and quinones on aqueous plants and their blocking of SH-groups // J. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 1977. Vol. 5. P. 291–298.
15. Stom D. I., Roth R. Some effects of polyphenols on aquatic plants. I. Toxicity of phenols in aquatic plants // Bull Environ. Contam. Toxicol. 1981. Vol. 27. P. 332–337.

**Kislitsina M. N.**, Ural Federal University (Ekaterinburg, Russian Federation)  
**Borisova G. G.**, Ural Federal University (Ekaterinburg, Russian Federation)

## RESPONCES OF *LEMNA MINOR* L. TO THE EXOGENOUS PHENOLIC COMPOUNDS ACTION

The study tested the morphological and physiological reactions of floating macrophyte *Lemna minor* L. under the exogenous phenolic compounds action. Plants were grown for 20 days in model systems under natural light at room temperature. Hydroquinone and resorcinol (1 and 10 mg L<sup>-1</sup>) were added in experimental vessels with water. Control plants were incubated in water without the addition of pollutants. Responses of *L. minor* to phenols action were studied by evaluating the degree of fronds depigmentation (in dynamics) and measuring the projected area of the epidermis and mesophyll cells and chloroplasts (after incubation). The degree of depigmentation of *L. minor* fronds depended on the type of pollutant and its concentration and exposure time. Hydroquinone caused a significant degree of fronds damage compared to the control plants and to plants under effect of resorcinol. Mesophyll cells of *L. minor* incubated with resorcinol were smaller in comparison with the control ones. Hydroquinone did not have significant impact on the projected area of the mesophyll cell. The size of epidermal cells in the presence of resorcinol (10 mg L<sup>-1</sup>) decreased compared to the control ones, but their number increased (compared with the hydroquinone). In the presence of hydroquinone (1 and 10 mg L<sup>-1</sup>) epidermal cell size increased (on average 20 % compared to control). The chloroplasts projection area decreased under the hydroquinone and resorcinol action, and to the greatest extent – at a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup>. The research results lead to the conclusion about the possibility of using *L. minor* as a test-object for the bioassay of wastewater polluted by phenolic compounds.

Key words: hydroquinone, resorcinol, toxicity, *Lemna minor* L., depigmentation, size of cells and chloroplasts, biotesting wastewater

## REFERENCES

1. Borisova G. G., Kislitsina M. N., Chukina N. V. Study of the phenolic compounds toxic effect on aquatic plants [Issledovanie toksicheskogo deystviya fenol'nykh soedineniy na vodnye rasteniya]. *Vodnoe khozyaystvo Rossii*. 2010. № 4. P. 94–103.
2. Getko N. V. *Rasteniya v tekhnogennoy srede: struktura i funktsii assimilyatsionnogo apparata* [Plants in the man-made environment: structure and function of the assimilation apparatus]. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1989. 208 p.
3. Kapitonova O. A. Specific anatomical features of vegetative organs in some macrophyte species under conditions of industrial pollution. *Russian Journal of Ecology*. 2002. Vol. 33. № 1. P. 59–61.
4. Kvesitadze G. I., Khatiashvili G. A., Sadunishvili T. A., Evstigneeva Z. G. *Metabolizm antropogennykh toksikantov v vysshikh rasteniyakh* [Metabolism of anthropogenic toxicants in higher plants]. Moscow, Nauka Publ., 2005. 198 p.
5. Kirso U. E., Stom D. I., Belykh L. I., Irkha N. I. *Prevrashchenie kantserogennykh i toksicheskikh veshchestv v gidrosfere* [The transformation of the carcinogenic and toxic substances in the hydrosphere]. Tallin, Valgus Publ., 1988. 271 p.
6. Kislitsina M. N., Borisova G. G. Hydroquinone and resorcinol effect on morphometric parameters of *Elodea canadensis* michx. and *Potamogeton perfoliatus* L. [Vliyanie gidrokhinona i rezortsina na morfometricheskie kharakteristiki *Elodea canadensis* Michh. i *Potamogeton perfoliatus* L.]. *Fenol'nye soedineniya: fundamental'nye i prikladnye aspekty: Sbornik materialov IX Mezhdunarodnogo simpoziuma*. Moscow, 2015. P. 292–295.
7. Kislitsina M. N., Eremin M. S. *Programma rascheta ploshchadi ob'ektov na ploskosti "Kontur-Shay"* [The program for calculating the objects area on the plane "Contour-Shade"]. Certificate of computer programs of state registration no 2015662124. Request № 2015618128 from 01.09.2015. Reg. date 17.11.2015.
8. Mokronosov A. T., Borzenkova R. A. Methods of quantitative evaluation of the structure and functional activity of photosynthetic tissues and organs [Metodika kolichestvennoy otsenki struktury i funktsional'noy aktivnosti fotosinteziruyushchikh tkanei i organov]. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii* [Transactions of applied botany, genetics and breeding]. 1978. Vol. 61. P. 119–133.
9. Stom D. I. *Fitotoksichnost' i mekhanizm detoksifikatsii fenolov vodnymi rasteniyami: Avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk* [Phytotoxicity and detoxification of phenols by the aquatic plants. Dr. biol. sci. diss.]. Kiev, 1982. 48 p.
10. Chukina N. V., Borisova G. G. Structural and functional induces of higher aquatic plants from habitats differing in levels of anthropogenic impact. *Inland Water Biology*. 2010. № 3 (1). P. 44–50.
11. Tatsenko L. V., Malyuga N. G. Sensitivity of different tests for water pollution with heavy metals and pesticides based on the use of common duckweed. *Russian Journal of Ecology*. 1998. Vol. 29. № 5. P. 360–362.
12. Park J. S., Brown M. T., Han T. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata* // *Aquatic Toxicology*. 2012. Vol. 106–107. P. 182–188.
13. Sragg A. H. The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella VT-1* // *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. Vol. 39. P. 796–799.
14. Stom D. I. Influence of polyphenols and quinones on aqueous plants and their blocking of SH-groups // *J. Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 1977. Vol. 5. P. 291–298.
15. Stom D. I., Roth R. Some effects of polyphenols on aquatic plants. I. Toxicity of phenols in aquatic plants // *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 1981. Vol. 27. P. 332–337.