

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
НА ИЗМЕНЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА В ЛИСТОВЫХ ПЛАСТИНКАХ
БИОИНДИКАЦИОННЫХ РАСТЕНИЙ-ГИДРОФИТОВ
НА ПРИМЕРЕ РОГОЛИСТНИКА ТЕМНО-ЗЕЛЕННОГО (*CERATOPHYLLUM
DEMERSUM L.*)**

Ильяшенко Н.В., Оленева Ю.Г., Иванова А.И., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.

ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», Тверь, Россия (170100, г. Тверь, ул. Желябова, 33), e-mail: nadya_bioecology@mail.ru

Методами Фурье-ИК-спектроскопии, растровой электронной микроскопии (РЭМ) и рентгеновского микроанализа (РМА) изучено влияние факторов окружающей среды на химический состав и анатомическое строение листьев биоиндикационных растений-гидрофитов (роголистник темно-зеленый). Установлена зависимость между наличием изменений интенсивности и положением полос поглощения в ИК-спектрах образцов растений и антропогенным загрязнением места обитания растений. Обнаружена деформация клеток эпидермиса в образцах листьев растений из мест с загрязнением поллютантами. Приводятся результаты исследований методом рентгеновского микроанализа о наличии в тканях роголистника различных химических элементов, в образцах из мест с антропогенным загрязнением обнаружены тяжелые металлы. Все вышеперечисленные реакции в условиях загрязнения окружающей среды следует рассматривать как защитно-приспособительные механизмы клеток. Данный факт свидетельствует о высокой аккумулятивной и адаптационной способности водных растений.

Ключевые слова: Фурье-ИК-спектроскопия, растровая электронная микроскопия, рентгеновский микроанализ, растения-гидрофиты, антропогенное загрязнение.

**EFFECT OF AMBIENT ENVIRONMENT FACTORS ON THE CHEMICAL
COMPOSITION CHANGES IN LEAF PLATELETS OF BIOINDICATIVE
HYDROPHYTIC PLANTS AFTER THE EXAMPLE OF DEEP GREEN HORNWORT
(*CERATOPHYLLUM DEMERSUM L.*)**

Pyashenko N.V., Oleneva Yu.G., Ivanova A.I., Khizhnyak S.D., Pakhomov P.M.

FSBE IVT «Tver State University», Tver, Russia (170100, Tver, Zheliabova Str., 33), e-mail: nadya_bioecology@mail.ru

A study is made of the influence of ambient environment factors on the chemical composition and anatomic constitution of the foliage of bioindicator hydrophytic plants (deep green hornwort) making use of the Fourier transform IR spectroscopy, scanning electron microscopy and X-ray microanalysis (XMA) methods. A correlation is established between the occurrence of intensity changes and position of absorption bands in the IR spectra of the plant samples and anthropogenic pollution of the places of their inhabitation. Deformation of epidermis cells in the plant leaf samples taken from the polluted places. The results of the study of chemical composition of hornwort tissues are presented. Heavy metals were detected in the samples taken from the polluted places. The above-listed reactions observed under the condition of polluted environment should be regarded as protective-adaptive mechanisms of the cells. This fact is indicative of high accumulative and adaptive properties of aquatic plants.

Keywords: Fourier-Transform IR spectroscopy, scanning electron microscopy, X-ray microanalysis, hydrophytic plants, anthropogenic pollution.

Введение

Высшие водные растения обладают высокой аккумулятивной способностью и используются для определения антропогенных химических нагрузок на водоем в системе биомониторинга состояния окружающей среды [2, 7; 8].

Поскольку под действием антропогенного загрязнения окружающей среды в растениях-биоиндикаторах могут происходить изменения на химическом и анатомическом уровнях, то эффективными методами изучения этих изменений являются Фурье-ИК-спектроскопия, РЭМ и РМА. Точная идентификация типов образуемых соединений в результате накопления растением разных поллютантов позволяет с успехом использовать метод ИК-спектроскопии в биомониторинге кислотного загрязнения [1; 2; 7]. Сочетание РМА и РЭМ позволяет определять элементный состав в объеме ~ 1 мкм³ посредством регистрации рентгеновского излучения. Энергия фотонов, попадающих в детектор, преобразуется в электрический сигнал, который формирует спектр рентгеновского излучения, где каждому химическому элементу соответствует определенный набор пиков, позволяющий идентифицировать элементный состав с проведением количественного анализа [10].

Цель работы – изучение влияния поллютантов на химический состав и анатомическую структуру листа роголистника темно-зеленого методами ИК-спектроскопии, РЭМ и РМА.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – *Ceratophyllum demersum* L. (Роголистник темно-зеленый). Исследуемый вид (гидрофит) встречается в Тверском регионе в стоячих, медленно текущих водах и способен произрастать как в чистых, так и загрязненных местах обитания [7]. Сбор растений и забор воды на химический анализ производился в водоемах на территории Тверской обл., которые делили по фактору близости к источнику загрязнения на две группы – фоновый и загрязненные (табл. 1).

Таблица 1 – Места сбора *C. demersum*

№	Водоемы	Экологический статус / Источник загрязнения [8]		Основные поллютанты [8]
I	Р. Межа, дер. Большое Федоровское, Нелидовский р-н Тверской обл.	ООПТ* (фоновый участок), Центрально-лесной государственный природный биосферный заповедник		–
II	Озеро-охладитель Удомля, г. Удомля Тверской обл.	Узлы экологической напряженности	Калининская АЭС	Нефтепродукты, малые дозы радиации
III	Сточный канал, п. Редкино Конаковского		ОАО «Редкинский	Нефтепродукты, неорганические

	р-на Тверской обл.		опытный завод»	анионы, аммиак, ароматические соединения, АПАВ**
--	--------------------	--	----------------	--

*ООПТ – Особо охраняемая природная территория.

**АПАВ – анионные поверхностно-активные вещества.

Для последующей интерпретации результатов элементного состава и ИК-спектров образцов растений параллельно был проведен химический анализ воды исследуемых водоемов произрастания *C. demersum*. Анализ проб воды осуществлялся с помощью спектрофлуориметра «Флюорат-02-панорама» и системы капиллярного электрофореза «Капель-105» фирмы «Люмэкс». Определение неорганических анионов, анионных поверхностно-активных веществ, нефтепродуктов, фенолов в воде проводилось в соответствии с методиками [3–6].

Для записи ИК-спектров исследуемых образцов использовалась методика с KBr [9]. Спектры регистрировали на Фурье-ИК-спектрометре Equinox 55 фирмы Bruker в диапазоне 400–4000 см⁻¹.

Образцы высушенных растений (30–40 °С), зафиксированных на углеродном скотче, исследовали при увеличении в 500 и 1000 раз в режиме высокого вакуума на растровом электронном микроскопе JEOL 6610LV; РМА проводился с помощью системы микроанализа INCA Energy SEM (OXFORD INSTRUMENTS).

Результаты исследования и их обсуждение

Химический анализ воды в исследуемых водоемах

Результаты химического анализа воды из указанных в табл. 1 водоемов показали наличие в ней поллютантов (табл. 2).

Таблица 2 – Химический анализ проб воды исследуемых водоемов

Показатель, мг/л	Проба		
	I (фон)	II	III
Cl ⁻	1.2	6.2	64.0
NO ₂ ⁻	<0.2	0.88	5.0
SO ₄ ²⁻	2.8	7.4	42.3
NO ₃ ⁻	<0.2	1.2	<0.2
PO ₄ ³⁻	<0.2	<0.2	<0.2
Нефтепродукты	0.17	-	0.16
Фенолы (общее)	0.001	-	0.38
АПАВ	0.11	-	0.09

Данные по основным показателям анализа воды (Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , фенолы, АПАВ) в пробах II, III значительно превышают фоновые значения (I).

В пробе воды III содержание примесей фенолов, неорганических анионов в несколько десятков раз выше данных показателей пробы I, что свидетельствует о сбросах химического производства ОАО «Редкинский опытный завод» (табл. 2).

Наличие различных поллютантов в водоемах необходимо учитывать в мониторинге, поскольку водные растения способны накапливать вещества-загрязнители (табл. 2) [1; 2; 7].

ИК-спектральный анализ образцов *C. demersum*

На рис. 1 представлены ИК-спектры образцов *C. demersum* из различных водоемов. ИК-спектральный анализ показал, что все исследуемые виды имеют полосы поглощения, соответствующие основному химическому составу растения: углеводам ~56% (от абсолютного сухого веса), белкам ~18%, жирам ~1% [7].

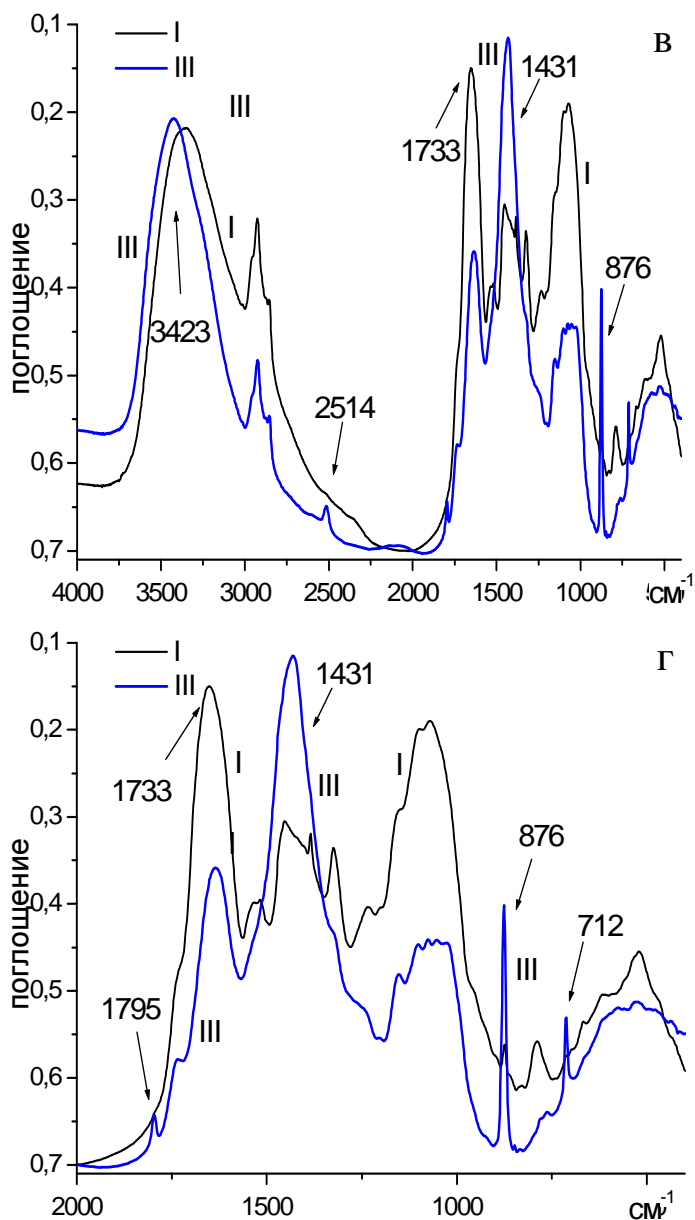


Рис. 1. ИК-спектры образцов *C. demersum*: I и II (а, б); I и III (в, г).

О присутствии углеводов в растении свидетельствуют полосы поглощения, обусловленные валентным колебанием CH_2 -групп на частоте $\sim 2925 \text{ см}^{-1}$ и OH -групп на частотах $\sim 3400 \text{ см}^{-1}$ [2; 9]. О наличии белков свидетельствуют полосы поглощения на частотах $\sim 1640 \text{ см}^{-1}$ (Амид I), ~ 1535 (Амид II), ~ 1235 (Амид III) [2; 9]. О присутствии жиров можно судить по наличию полос поглощения на частотах ~ 1735 ($\nu_{\text{C=O}}$), ~ 1446 (δ_{CH_2-}) (табл. 3) [9].

При сравнении ИК-спектров образцов *C. demersum* из фонового и загрязненных водоемов отмечено значительное изменение химического состава растений. Причем наиболее существенные изменения в интенсивности полос поглощения обнаружены в образцах, собранных в зоне промышленного загрязнения. В образцах из водоемов, не подверженных прямому загрязнению, интенсивность полос находится на уровне фоновых значений.

Спектры образцов растений из загрязненных местообитаний (рис. 1) демонстрируют существенные изменения на частотах: $\sim 2514 \text{ см}^{-1}$ (III), обусловленные валентными колебаниями S-H групп; $\sim 1794 \text{ см}^{-1}$ – валентными колебаниями C=O групп (III); $\sim 876 \text{ см}^{-1}$ – валентными симметричными колебаниями S-O-C группы (III) и $\sim 712 \text{ см}^{-1}$ – валентными колебаниями C-S-C групп (III) (табл. 3) [2; 9]. Полоса поглощения $\sim 1431 \text{ см}^{-1}$, характеризующаяся $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$, $\delta(\text{N-H})$, проявляется во всех спектрах образцов из загрязненных зон, однако наиболее интенсивна в спектре образца III, что связано с высоким содержанием в водной среде серосодержащих анионов, поглощаемых растением (рис. 1), (табл. 3).

Таблица 3 – Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах образцов *C. demersum*

Положение полосы, см^{-1}			Отнесения	Источник
I	II	III		
3350	3393	3423	$\nu(\text{OH})$	[2; 9]
2926	2925	2925	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	[2; 9]
2855	2855	2854	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	
–	–	2514	$\nu(\text{S-H})$	[9]
–	–	1795	$\nu(\text{C=O})$	[9]
1733	1738	1735	$\nu(\text{C=O})$	[2; 9]
1653	1653	1637	Амид I $\nu(\text{C=O})$	[2; 9]
1533	1542	–	Амид II $\nu(\text{O-C-N})$	[2; 9]
–	1438	1431	$\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$, $\delta(\text{N-H})$	[9]
1385	1385	–	$\delta(\text{OH})$	[9]
1325	1325	1325	$\delta(\text{CH}_2)$	[9]
1233	1230	1265	Амид III $\delta(\text{N-H})$	[2; 9]
1201	1202	1204	$\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{OH})$	[9]
1098	1153	1101	$\nu(\text{C-O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$	[2]
1071	1078	1077	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$	[9]
–	–	1052	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$	
–	–	1025	$\nu(\text{OH})$	
874	874	876	S-O-C	[2; 9]
–	–	712	$\nu(\text{C-S-C})$	[9]

Сравнительный анализ *C. demersum* из разных местообитаний позволяет предположить, что рост интенсивности выше указанных полос поглощения в образцах, взятых из загрязненных водоемов, может быть связан с аккумуляцией и усвоением химических соединений, не свойственных растению, содержащих тиольные, углерод- и азотсодержащие группы [2; 9].

Изучение образцов растений-гидрофитов с помощью РМА и РЭМ

Микрофотографии и рентгеновские спектры образцов растений *C. demersum*, исследованные методом РЭМ и РМА, представлены на рис. 2.

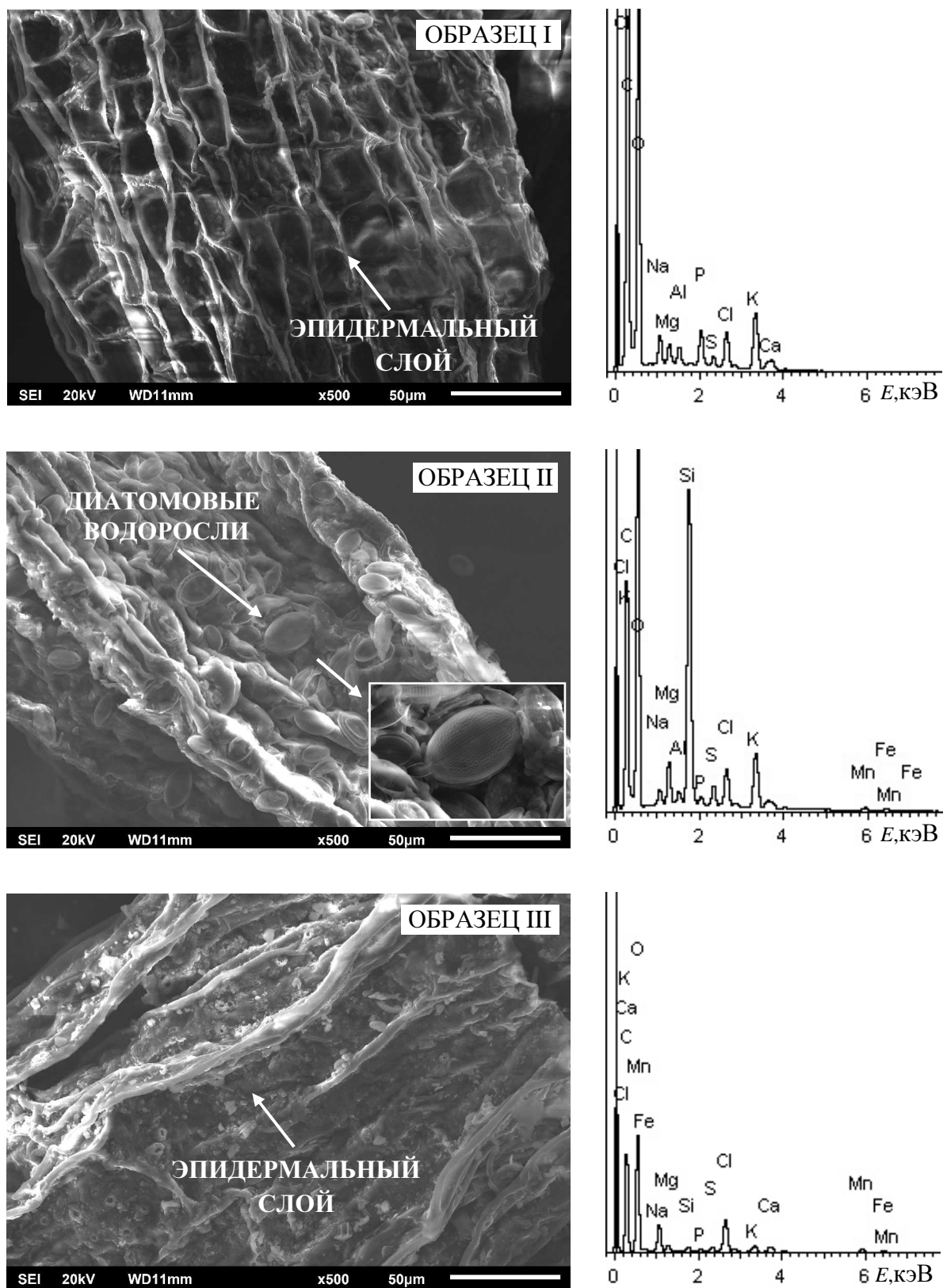


Рис. 2. Электронные изображения и рентгеновские спектры образцов листьев *C. demersum* I, II, III.

Как видно из приведенных микроизображений, в образцах растений *C. demersum*, собранных в загрязнённой зоне, наблюдается деформация и разрушение клеток эпидермиса

(образец III), вследствие чего эпидермальный клеточный слой частично теряет свою целостность [10].

В образце II (оз. Удомля) обращает на себя внимание высокая плотность расположенных на эпидермальном слое исследуемого растения-гидрофита диатомовых водорослей (*Diatomea* sp.). Такое обрастание листьев роголистника водорослями, по-видимому, обусловлено благоприятными для их жизнедеятельности условиями, связанными с повышенным тепловым режимом оз. Удомля Калининской АЭС [1; 10].

Методом РМА определен элементный состав и проведен количественный химический анализ в образцах растений *C. demersum* (рис. 2). Ниже (табл. 4) приводятся результаты исследований по элементному составу и наличию в тканях *C. demersum* различных химических элементов из некоторых водоемов Тверской области.

Таблица 4 – Элементный химический состав *C. demersum*

Образец	Химический элемент	C	O	Na	Mg	Al	P	S	Cl	K	Ca	Si	Mn	Fe	Итого
I	Вес, %	56.35	40.90	0.61	0.27	0.18	0.41	0.11	0.41	0.67	0.12	–	–	–	100
II		48.34	45.31	0.34	0.68	0.11	0.12	0.23	0.50	0.75	–	3.48	0.07	0.06	100
III		53.44	41.92	1.93	0.27	–	0.05	0.14	1.25	0.25	0.26	0.09	0.26	0.11	100

Данные РМА отражают общий химический состав *C. demersum* [6]. Однако в образцах II и III содержание марганца, железа, серы, хлора выше, чем в фоновом образце, что согласуется с результатами химического анализа воды изучаемых водоемов (табл. 2). Кроме того, в образце II отмечено высокое содержание кремния (рис. 2). Очевидно, источником кремния служит содержащий кремнезем «панцирь» обнаруженных на листьях роголистника диатомовых водорослей [1; 10].

Выводы

С помощью метода Фурье-ИК-спектроскопии удалось доказать способность высших водных растений активно реагировать на изменение химического состава воды ростом интенсивности полос поглощения, связанных с загрязняющими веществами. Материалы исследования позволяют рекомендовать метод Фурье-ИК к использованию в целях эффективного биомониторинга загрязненных водных объектов. При использовании метода РЭМ в биомониторинге на примере *C. demersum* растений отмечены анатомические изменения в листовых пластинках, наблюдаются деформация и разрушение клеток эпидермиса, что свидетельствует о высокой аккумулятивной и адаптационной способности водных растений. Методом РМА определен элементный состав изучаемых растений, в образцах из мест с антропогенным загрязнением обнаружены тяжелые металлы.

Используемые в работе физические методы анализа могут быть эффективно использованы в биомониторинге окружающей среды.

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования Тверского государственного университета за помощь в проведении экспериментальных исследований, связанных с растровой электронной микроскопией. Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, ГК № 14.740.11.1281 и при поддержке гранта Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «Участник Молодежного Научно-инновационного Конкурса» («У.М.Н.И.К.»), ГК № 8754р /14008.

Список литературы

1. Баринаева С.С., Анисимова О.В., Медведева Л.А. Водоросли-индикаторы в оценке качества окружающей среды. – М. : ВНИИПрироды, 2000.
2. Ильяшенко Н.В. Использование метода Фурье-ИК спектроскопии для изучения изменений химического состава *Potentilla erecta* (L.) Raeusch. под действием антропогенных факторов / Н.В. Ильяшенко, В.Д. Ильяшенко, Дементьева С.М., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. – 2009. – Вып. 13. – С. 211-221.
3. Определение неорганических анионов в воде, методика М 01-30-2009 ПНД Ф 14.1:2:4.157-99, 2009 г.
4. Определение анионных поверхностно-активных веществ (АПАВ) в воде, методика М 01-06-2009 ПНД Ф 14.1:2:4.158-2000 ГОСТ Р 51211-98, 2009.
5. Определение нефтепродуктов в воде, методика М 01-05-2007 ПНД Ф 14.1:2:4.128-98 МУК 4.1.1262-03, 2007.
6. Определение фенолов в воде, методика МВИ М 01-07-2006 ПНД Ф 14.1:2:4.182-02 МУК 4.1.1263-03, 2006.
7. Садчиков А.П. Кудряшов М.А. Гидробиология: прибрежно-водная растительность : учеб. пособ. для студ. высш. учеб. заведений. – М. : Академия, 2005.
8. Экология города / под ред. А.С. Курбатова. – М. : Научный мир, 2004.
9. Infrared Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts / Ed. by G. Socrates. London : John Wiley & Sons., 1994.
10. Pathan A.K., Bond J., Gaskin R.E. Sample preparation for SEM of plants surfaces // Materials today, Electron microscopy special issue. – 2009. – Vol. 12. – P. 32–43.

Рецензенты:

Миняев В.И., профессор, д.б.н., зав. кафедрой анатомии и физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО «Тверской государственной университет», г. Тверь.

Зиновьев А.В., профессор, д.б.н., профессор кафедры зоологии ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», г. Тверь.