

УДК 581.192:577.7.15:574.24

**ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ВЛИЯНИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ВОДНОЕ РАСТЕНИЕ  
*HYDRILLA VERTICILLATA***

**О. А. Розенцвет<sup>1</sup>, В. Н. Нестеров<sup>1</sup>, Н. Ф. Синютина<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Институт экологии Волжского бассейна РАН  
Россия, 445003, Тольятти, Комзина, 10*

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургский государственный университет  
Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9  
E-mail: olgarozen@pochta.ru*

Поступила в редакцию 01.03.10 г.

**Эколого-физиологические и биохимические аспекты влияния ионов тяжелых металлов на водное растение *Hydrilla verticillata*.** – Розенцвет О. А., Нестеров В. Н., Синютина Н. Ф. – Исследованы динамика аккумуляции тяжелых металлов (ТМ) водным растением *Hydrilla verticillata*, особенности их воздействия на рост и интенсивность процесса фотосинтеза. Выявлено, что чем выше степень повреждений, вызванная воздействием ТМ, тем интенсивнее происходит синтез липидов. Сделано заключение, что структурные нарушения биомембран являются одной из причин подавления процессов роста растения, а изменения метаболизма липидов – способом компенсации отрицательного воздействия ТМ.

*Ключевые слова:* водные экосистемы, накопление тяжелых металлов, рост, фотосинтез, метаболизм липидов, *Hydrilla verticillata*.

**Ecological, physiological and biochemical aspects of the influence of heavy metal ions on aquatic plant *Hydrilla verticillata*.** – Rozentsvet O. A., Nesterov V. N., and Sinyutina N. F. – The dynamics of heavy metal (HM) accumulation by the aquatic plant *Hydrilla verticillata*, features of their influence on the growth and intensity of photosynthesis were investigated. The higher the degree of HM-caused damages, the more intense lipid synthesis is. It is concluded that structural infringements of biomembranes are one of the causes of plant growth suppression, and the established changes of lipid metabolism is a way of compensation of the negative influence of HM.

*Key words:* aquatic ecosystems, heavy metal accumulation, growth, photosynthesis, lipid metabolism, *Hydrilla verticillata*.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Одним из наиболее опасных и широко распространенных видов загрязнений биосферы являются тяжелые металлы (ТМ) (Титов и др., 2007). Водные экосистемы часто становятся финальным резервуаром для многих видов поллютантов, включая ТМ (Брагинский, 1998). Высшая водная растительность способна аккумулялировать ТМ в достаточно больших количествах без ущерба для роста, используя физиолого-биохимические адаптивные механизмы, среди которых не последнюю роль играют липиды (Прасад, 2003). В литературе имеются обширные сведения о качественных и количественных изменениях липидного комплекса растительных клеток при неблагоприятных воздействиях температуры, засухи, засоления, аноксии (Harwood, 1999).

Среди физиологических процессов, определяющих рост и продуктивность растений, наиболее важным является фотосинтез (Мокроносков, Гавриленко, 1992). Основной фотосинтетической единицей в клетке растений являются хлоропласты. Липиды тилакоидных мембран хлоропластов создают среду для функционирования компонентов фотосистем, регулируют взаимодействие отдельных комплексов. Такие липиды как моногалактозилдиацилглицерол, дигалактозилдиацилглицерол и фосфатидилглицерол, как правило, выполняют структурную роль, участвуя в образовании тилакоидных мембран и светособирающего комплекса (Hölzl, Dörman, 2007). Сульфохиновозилдиацилглицерол обладает каталитической активностью. Фотосинтетические пигменты, выполняющие функцию фотоассимиляции, сосредоточены в гранах хлоропластов.

Изменяя структуру хлоропластных мембран, фотосинтетический аппарат растений реагирует на смену внешних условий (освещение, температура, влажность, минеральное питание). В связи с этим структурно-функциональные характеристики хлоропластов могут быть использованы для выявления специфики воздействия определенных ТМ и адаптивных возможностей высших водных растений к действию ТМ.

Целью данной работы было изучение изменения состава, содержания и метаболизма липидов хлоропластных мембран *Hydrilla verticillata* (L. fil.) Royle, 1839 (гидриллы мутноватая) под действием Cu, Zn и Cd в концентрации 100 мкМ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Объект исследования* – водное погруженное сосудистое растение *Hydrilla verticillata* семейства Hydrocharitaceae, порядка Hydrocharitales, класса Liliopsida, широко применяемый вид для экологических исследований.

*Постановка эксперимента.* Растения инкубировали в условиях освещения – 1400±200 лк при 10-часовом световом дне и температуре 20°C на 5%-ной среде Хогланда – Арнона в отсутствие (контроль) и присутствии солей Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> в течение 1, 2 и 3 суток. Рост растений оценивали по приросту фитомассы.

*Содержание ТМ в тканях растений* определяли на атомно-адсорбционном спектрофотометре «МГА-915» (Россия) после мокрого озоления (Голубкина, 1995).

*Фотосинтез.* Процесс фотосинтеза оценивали по содержанию O<sub>2</sub> в воде с помощью электрода Кларка (Гавриленко, Жигалова, 2003).

*Определение пигментов.* Содержание пигментов определяли в ацетоновом экстракте (90%) на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия) при λ 662, 645 и 470 нм. Расчет концентрации хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов производили по методу Н. К. Lichtenthaler и R. R. Welburn (1983).

*Выделение хлоропластов.* Фракции, обогащенные хлоропластами, выделяли методом дифференциального центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы из тканей растений после 3-суточного инкубирования с ионами ТМ (Синютина, Коузова, 2005).

*Экстракция и анализ липидов.* Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 1:2 (по объему) (Кейтс, 1975) и разделяли методом тон-

кослойной хроматографии как описано ранее (Нестеров и др., 2009). Количество фосфолипидов определяли по содержанию неорганического фосфора (Vaskovsky, Latyshev, 1975), а гликолипидов – на денситометре «Sorbfil» (Россия).

Жирные кислоты анализировали в виде их метиловых эфиров на газожидкостном хроматографе «Хроматэк. Кристалл 5000.1» (Россия) с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0.25 мм «RESTEK» (США) в изотермическом режиме. Температура колонки – 180°C, испарителя и детектора – 260°C. Скорость тока газа-носителя (гелий) – 20 мл/мин.

*Определение интенсивности обмена липидов.* Растения после инкубирования в присутствии солей Cu, Cd и Zn выдерживали 1 ч в воде с 185 кБк [2-<sup>14</sup>C]-ацетатом натрия. Включение 2-<sup>14</sup>C-ацетата в липиды измеряли с помощью счетчика «Beckman LS-100» (Германия).

*Статистический анализ результатов.* Статистическая обработка первичных данных производилась по общепринятым методикам и включала расчет средней арифметической из трех независимых экспериментов ( $M$ ) и стандартного отклонения от средней арифметической ( $m$ ). Достоверность различий измеряемых величин между контрольными и опытными вариантами оценивали на основании  $t$ -критерия Стьюдента при доверительном интервале  $P \leq 0.05$ . Расчеты выполняли с применением электронных таблиц Microsoft Excel.

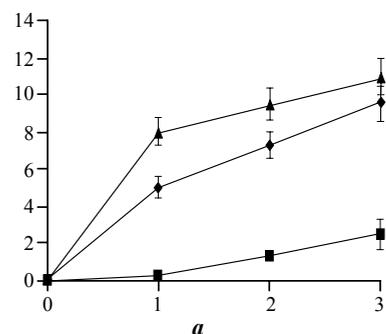
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что растения значительно различаются по способности поглощать и аккумулировать ТМ (Титов и др., 2007). По характеру накопления ТМ описаны три типа стратегий растений: исключение, биоиндикация и гипераккумуляция (Прасад, 2003). Данные, приведенные на рис. 1, *a*, показывают, что исследуемый вид растений обладает выраженной концентрационной способностью по отношению к исследованным ТМ. При равном содержании солей металлов в среде выращивания растения в большей степени накапливали ионы Cd, что дает основание отнести *H. verticillata* к растениям-аккумуляторам отдельных металлов.

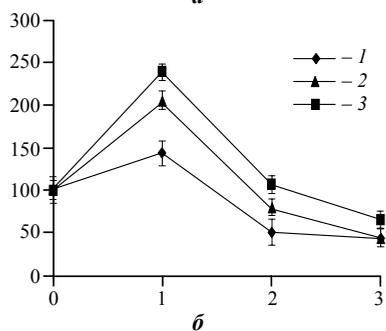
Одним из общих проявлений токсичности ТМ является торможение роста. У наземных растений возрастающие дозы ТМ вызывают в первую очередь замедление роста корней (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989). Водные растения, особенно погруженные, в том числе *H. verticillata*, поглощают вещества из воды всей поверхностью тела. Как показали наши эксперименты, рост растений через одни сутки действия всех исследованных металлов увеличивался в 1.3 – 2.5 раза по сравнению с контролем, на вторые сутки рост замедлялся, на третьи – ингибировался (рис. 1, *б*). В исследованиях М. Wojick, А. Tukendorf (1999) показана способность некоторых металлов (Cd, Zn, Pb) в небольших концентрациях оказывать стимулирующее влияние на рост растений. В условиях наших экспериментов односуточная экспозиция *H. verticillata* в среде, содержащей одинаковые концентрации солей Cu, Zn и Cd, также приводила к усилению роста, а более длительная – к его существенному снижению. По степени негативного влияния на рост ТМ располагаются в последовательности Cu → Cd → Zn, что в целом соответствует ряду общей

фитотоксичности, представленной для наземных растений (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989).

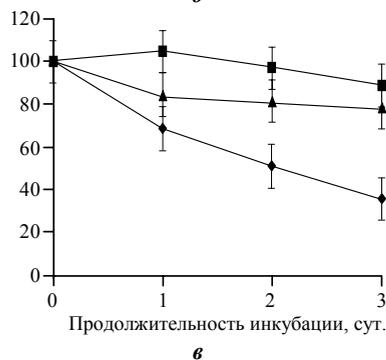
Уровень выделяемого клетками *H. verticillata*  $O_2$ , отражающий интенсивность



фотосинтеза, снижался при действии Cu на 30 – 60% в зависимости от его продолжительности, Cd – на 15 – 20%, Zn – не более чем на 10% к концу экспозиции (рис. 1, в).



Критерием, свидетельствующим об эффективности фотосинтеза, является также количество зеленых и желтых пигментов. Начиная со вторых суток воздействия, в растениях, инкубированных с ионами Cu, количество хлорофилла *a* снижалось на 28 – 60%, хлорофилла *b* на 24 – 43% по сравнению с контролем (рис. 2, а, б). Подобная тенденция наблюдалась и при действии ионов Zn и Cd. Однако при кратковременном (1 сутки) влиянии Cd отмечено увеличение содержания хлорофилла *b* (рис. 2, б). Как следствие, суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* снижалось под действием Cu в большей степени (1.4 – 2.2 раза), чем под действием Zn и Cd (в 1.1 и 1.4 раз соответственно) (рис. 2, в). В отличие от наземных растений, у которых содержание хлорофилла *b* обычно более чувствительно к действию ТМ, чем хлорофилла *a* (Караваева и др., 2001), для *H. verticillata* выявлена противоположная тенденция. Действие Zn в равной степени приводило к снижению содержания хлорофиллов *a* и *b*.

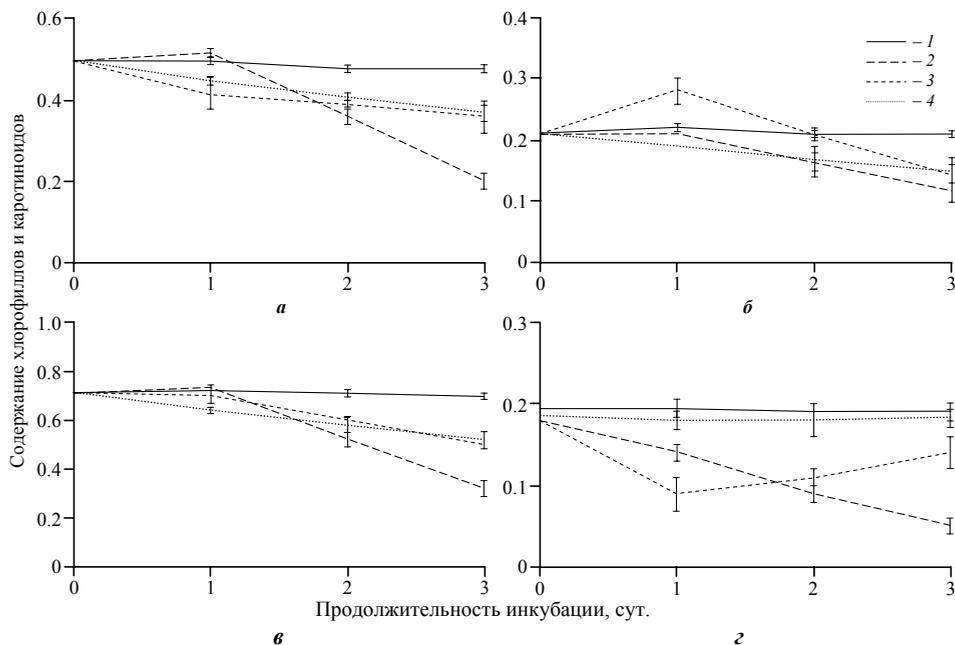


Динамика содержания каротиноидов, как и хлорофиллов, зависела от вида металла. При действии Cu их количество снижалось по отношению к контролю более чем на 50%, начиная со вторых суток воздействия, Cd – на 25 – 50% в зависимости от времени экспозиции. Действие Zn не вызывало нарушений в содержании каротиноидов (рис. 2, г).

**Рис. 1.** Аккумуляция ионов тяжелых металлов (а) (мг/г сух. массы) в тканях *Hydrilla verticillata*, их влияние на прирост фитомассы (б) (% от контроля) и содержание кислорода в воде (в) (% от контроля): 1 – Cu, 2 – Cd, 3 – Zn

Таким образом, содержание основных форм пигментов в тканях *H. verticillata* снижалось под действием всех исследованных ионов ТМ. Отличия в реакции пигментов водных растений от наземных на действие ТМ, по-видимому, связаны с особенностями строения фотоассимилирующих органов (отсутствие

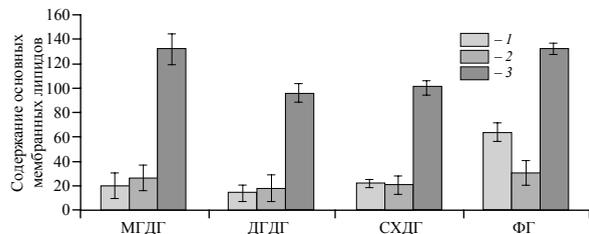
устийц, редукция механических тканей и др.), спецификой пигментного аппарата (более низкое отношение суммы хлорофиллов  $a+b$ /каротиноиды в сравнении с наземными растениями).



**Рис. 2.** Влияние тяжелых металлов на содержание хлорофилла  $a$  ( $a$ ), хлорофилла  $b$  ( $б$ ), суммы хлорофиллов  $a+b$  ( $в$ ), каротиноидов ( $г$ ) в клетках *Hydrilla verticillata* (мг/г сыр. массы): 1 – контроль, 2 – Cu, 3 – Cd, 4 – Zn

Причинами нарушения фотосинтеза под действием ТМ считают изменение ультраструктуры хлоропластов, уменьшение количества гран и размеров хлоропластов, а при высоких концентрациях металла – снижение и числа зеленых пластид в клетке (Титов и др., 2007). Как отмечалось выше, основными структурными компонентами мембран хлоропластов, на которых и протекают химические реакции световой и темновой фаз фотосинтеза, являются полярные липиды – гликолипиды и фосфатидилглицерол. Важно было оценить состояние данных молекул в клетках *H. verticillata*. Для этого из тканей растений, инкубированных в течение трёх суток с ионами ТМ, выделяли фракции, обогащенные хлоропластами. Оказалось, что под действием Cu и Cd содержание моно- и дигалактосодержащих липидов снижалось более чем в 5 раз (рис. 3). Содержание фосфатидилглицерола также снижалось в сравнении с контролем, но негативный эффект от действия Cd был выражен в большей степени в сравнении с действием Cu. Совершенно противоположное действие на состояние липидов хлоропластов оказывали ионы Zn: содержание гликолипидов и фосфолипида увеличивалось.

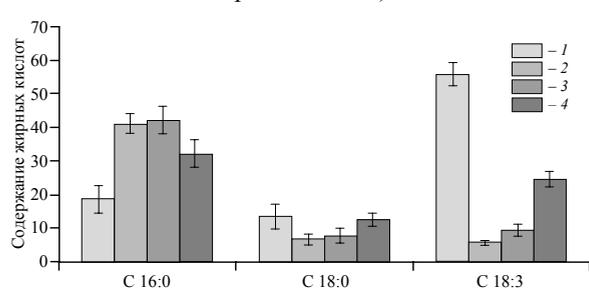
Одновременно с изменением количества полярных липидов менялся состав жирных кислот. Наибольшие изменения в их составе связаны с увеличением содержания насыщенной кислоты  $C_{16:0}$  и снижением содержания ненасыщенных кислот  $C_{18:3}$  (рис. 4).



**Рис. 3.** Влияние ТМ на содержание липидов мембран фракции, обогащенной хлоропластами (% от контроля): 1 – Cu, 2 – Cd, 3 – Zn; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерол, ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерол, СХДГ – сульфохинозиддиацилглицерол, ФГ – фосфатидилглицерол

молекул затрагивают строение не только мембран тилакоидов, но и комплексов фотосистем и их субъединиц, что приводит к нарушению взаимодействия между ними и, как следствие, к снижению фотосинтеза и роста.

Проведение экспериментов по включению  $2-^{14}C$ -ацетата натрия (предшественника синтеза жирных кислот) позволило оценить интенсивность обмена основных групп липидов в контрольных вариантах растения *H. verticillata*, а также в условиях воздействия ТМ (таблица).



**Рис. 4.** Влияние тяжелых металлов на состав основных жирных кислот (ЖК) липидов мембран фракции, обогащенной хлоропластами (% от суммы ЖК): 1 – контроль, 2 – Cu, 3 – Cd, 4 – Zn

(более чем в 3 раза в сравнении с контролем), а при действии Zn – в моногалактозилдиацилглицерол (см. таблицу).

Следовательно, синтез липидов *de novo* в растениях, испытывающих воздействия разных ионов ТМ, не только не прекращался, но даже усиливался. Чем более негативные последствия вызывал элемент на физиологическом и биохимическом уровне, тем интенсивнее было включение метки в липиды мембран хлоропластов. Наиболее отрицательное воздействие на состояние растений и интенсивность фотосинтеза в сравнении с другими ТМ оказывали ионы Cu, и включения метки в

Полученные нами данные экспериментально подтверждают, что под действием Cu и Cd происходят изменения в архитектуре тилакоидов. Увеличение доли насыщенных цепей приводит к более плотной упаковке гран, что ограничивает подвижность белков, необходимую для их нормального функционирования. Изменения в содержании индивидуальных липидных

контрольных вариантах растения *H. verticillata*, а также в условиях воздействия ТМ (таблица). Суммарное включение метки в полярные липиды фракции хлоропластов при действии Cu и Cd увеличилось более чем в 2 раза в сравнении с контролем, при действии Zn – в 1.5 раза. Наибольшее включение метки под действием Cu и Cd происходило в фосфатидилглицерол

## ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

синтез липидов было выше, чем в контроле, почти в 3 раза. Наименьшей токсичностью обладали ионы Zn, и включение метки усиливалось не более чем в 1.5 раза. Полученные результаты дают основание рассматривать увеличение количества вновь синтезированных липидов в мембранах хлоропластов одним из механизмов биохимической адаптации растений к действию ионов ТМ, направленным на компенсацию отрицательного влияния ТМ. Интенсивность обмена липидов в значительной степени зависела от вида металла. Например, при действии Cu наибольшее включение ацетата натрия по отношению к контролю происходило в фосфолипид и моногалактозилдиацилглицерол, при действии Cd – в фосфолипид и дигалактозилдиацилглицерол. При действии Zn удельная радиоактивность моногалактозилдиацилглицерола возрастала, а дигалактозилдиацилглицерола и фосфолипидов даже снижалась по сравнению с контролем.

Влияние тяжелых металлов на включение 2-<sup>14</sup>C-ацетата натрия в липиды фракции, обогащенной хлоропластами *Hydrilla verticillata*

Металл	Удельная радиоактивность, % от контроля			
	МГДГ	ДГДГ	ФГ	Суммарные липиды
Контроль	100.0±4.0	100.0±4.1	100.0±5.1	100.0±5.0
Cu	183.8±9.1	164.2±7.5	348.1±15.1	286.1±6.3
Cd	136.3±5.8	220.0±10.2	482.9±25.1	262.3±3.1
Zn	133.9±10.3	55.8±5.7	90.9±8.0	146.5±3.1

*Примечание.* ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерол; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерол; ФГ – фосфатидилглицерол.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ионы всех исследованных металлов при содержании их в среде в концентрации 100 мкМ в течение трёх суток оказывали негативный эффект на рост и фотосинтез водного растения *H. verticillata*. Физиологические изменения происходили на фоне уменьшения количества основных форм пигментов и структурных липидов в мембранах хлоропластов. Однако отмечена явная индукция синтеза липидов хлоропластов. Следовательно, структурные нарушения биомембран являются одной из причин подавления процессов роста растения, а изменения метаболизма липидов – способом компенсации отрицательного воздействия ТМ. Полученные данные позволяют существенно расширить представления об экологических адаптациях растений, важных для решения вопросов фиторемедиации загрязненных водных и наземных экосистем, биомониторинга и рационального использования природных ресурсов, а также разработки инновационных технологий, направленных на создание устойчивых к техногенному загрязнению культур и растительных сообществ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Брагинский Л. П. Принципы классификации и некоторые механизмы структурно-функциональных перестроек пресноводных экосистем в условиях антропогенного пресса // Гидробиол. журн. 1998. Т. 34, № 6. С. 72 – 93.

Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. Большой практикум по фотосинтезу. М. : Академия, 2003. 256 с.

- Голубкина Н. А. Флуорометрический метод определения селена // Журн. аналит. химии. 1995. Т. 50. С. 492 – 497.
- Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М. : Мир, 1989. 439 с.
- Караваева В. А., Баулин А. М., Гордиенко Т. В., Давыдьков С. А., Тихонов А. Н. Изменение фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 1. С. 47 – 54.
- Кейтс М. Техника липидологии. М. : Мир, 1975. 323 с.
- Мокронос А. Т., Гавриленко В. Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1992. 320 с.
- Нестеров В. Н., Розенцвиг О. А., Мурзаева С. В. Изменение состава липидов у пресноводного растения *Hydrilla verticillata* (L. fil.) Royle в условиях аккумуляции и элиминации ионов тяжелых металлов // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 1. С. 97 – 106.
- Прасад М. Н. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 3. С. 768 – 780.
- Синютина Н. Ф., Коузова Е. Д. Роль липидов при действии абсцизовой кислоты в coleoptелях кукурузы // Вестн. С.-Петерб. ун-та. 2005. Сер. 3. Вып. 1. С. 86 – 90.
- Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск : Изд-во КарНЦ РАН, 2007. 172 с.
- Harwood J. L. Environmental effects on plant lipid biochemistry // Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications / Ed. J. L. Harwood. Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1999. P. 305 – 363.
- Hölzl G., Dörman P. Structure and function of glycerolipids in plants and bacteria // Progr. Lipid Res. 2007. Vol. 46. P. 225 – 243.
- Lichtenthaler H. K., Welburn R. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of extracts in different solvents // Biochem. Soc. Trans. 1983. Vol. 603. P. 591 – 592.
- Maleva M. G., Nekrasova G. F., Malec P., Prasad M. N. V., Strzalka K. Ecophysiological tolerance of *Elodea Canadensis* to nickel exposure // Chemosphere. 2009. Vol. 77. P. 392 – 398.
- Vaskovsky V. E., Latyshev N. A. Modified jung nickel is reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on Thin-Layer chromatograms // J. Chromatogr. 1975. Vol. 115. P. 246 – 249.
- Wojcik M., Tukendorf A. Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings // Acta Physiol. Plant. 1999. Vol. 49, № 2. P. 99 – 107.