

УДК 574.24

ВЗАИМНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАДМИЯ И МАРГАНЦА НА ПОГРУЖЕННЫЕ МАКРОФИТЫ (НА ПРИМЕРЕ ЭЛОДЕИ КАНАДСКОЙ)*

© 2016 г. М.Г. Малева, Н.В. Чукина, Г.Г. Борисова

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Ключевые слова: гидроэкосистемы, водные макрофиты, тяжелые металлы, аккумуляция, токсичность, фотосинтетические пигменты, флуоресценция хлорофилла, взаимодействие ионов.



М.Г. Малева



Н.В. Чукина



Г.Г. Борисова

В модельных системах изучено взаимодействие двух тяжелых металлов – токсичного кадмия (Cd^{2+}) и биогенного марганца (Mn^{2+}) на погруженный макрофит – *Elodea canadensis* Michx. Побеги элодеи длиной 10–15 см инку-

бировали в течение пяти суток в среде с добавлением металлов в концентрации 100 мкмоль (раздельно и совместно). В листьях элодеи проанализированы следующие показатели: накопление Cd^{2+} и Mn^{2+} ; содержание и соотношение фотосинтетических пигментов; уровень переменной флуоресценции хлорофилла (максимальный квантовый выход фотосистемы II, F_v/F_m). При инкубировании элодеи в среде с Cd^{2+} его содержание в листьях возрастало более чем в 1000 раз по сравнению с контролем. Инкубирование растений в присутствии Mn^{2+} увеличивало его содержание в 10 раз. При совместном действии солей кадмия и марганца накопление Cd^{2+} в листьях элодеи уменьшалось почти в два раза по сравнению с его отдельным внесением, в то время как накопление Mn^{2+} снижалось лишь на 40 %. Под действием ионов кадмия у элодеи существенно уменьшалось содержание всех фотосинтетических пигментов, а при действии ионов марганца – только количество хлорофиллов. Показано, что добавление марганца в среду с кадмием ослабляло токсичность последнего. Содержание хлорофилла *a*, каротиноидов и квантовый выход хлорофилла снижались в меньшей степени, чем при отдельном действии кадмия, что, вероятно, обусловлено ингибированием поглощения Cd^{2+} в присутствии Mn^{2+} .

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-08320 А) и программы 211 Правительства Российской Федерации, соглашение № 02.А03.21.0006

Загрязнение тяжелыми металлами различных компонентов окружающей среды, в т. ч. и гидроэкосистем, представляет одну из наиболее серьезных экологических проблем. Тяжелые металлы принято делить на две группы: металлы, физиологическая роль которых в настоящее время неизвестна (кадмий, свинец, ртуть и др.), и необходимые для жизнедеятельности живых организмов металлы (биогенные) [1].

Усиление антропогенного воздействия на гидроэкосистемы приводит к тому, что ионы тяжелых металлов накапливаются водными растениями в достаточно высоких количествах и по пищевым цепям могут поступать в организм человека.

Одним из наиболее широко распространенных и высокотоксичных тяжелых металлов является кадмий. Источники загрязнения водных объектов ионами кадмия – электростанции, предприятия горнодобывающей и металлургической промышленности, сельскохозяйственные предприятия и т. д. [1, 2]. К настоящему времени достаточно подробно изучено действие кадмия на организмы, в т. ч. и на растения. Показано, что накопление этого иона в растениях подавляет фотосинтез и дыхание, изменяет активность ферментов. Кадмий тормозит поглощение катионов: К, Са, Мп, Сu, Мg, Zn, Fe, а также нитрат-ионов [3–5].

Марганец, напротив, играет важнейшую роль в функционировании живых организмов. Этот поливалентный металл в растениях находится преимущественно в форме Mn^{2+} , однако может окисляться до Mn^{3+} и Mn^{4+} . Ионы марганца играют важную роль в процессах фотосинтеза, дыхания и азотном обмене. Они являются кофакторами либо активаторами многих ферментов, участвующих в важнейших метаболических реакциях [6]. Однако в повышенных концентрациях марганец, как и другие микроэлементы, может оказывать токсическое действие на растение [1].

Поскольку в природных условиях водные растения подвержены комплексному действию поллютантов, работы, посвященные исследованию одновременного действия нескольких тяжелых металлов на растения, становятся все более актуальными. Показано, что некоторые металлы при совместном присутствии проявляют антагонизм или синергизм, а взаимодействие других имеет аддитивный характер [7–12]. Однако результаты исследований совместного действия кадмия и марганца немногочисленны и достаточно противоречивы [13–17]. Получены они на наземных растениях, в то время как водные макрофиты остаются менее изученными [16, 17]. При оценке взаимного влияния металлов на растения внимание ученых, как правило, акцентировано на процессах поглощения ионов, а структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата остаются практически не исследованными. Между тем, именно фотосинтетический аппарат обеспечивает жизнедеятельность водных макрофитов

в различных экологических условиях и в значительной степени определяет биологическую продуктивность гидробиоценозов.

Цель работы – исследование взаимного влияния Cd^{2+} и Mn^{2+} на накопление этих ионов и фотосинтетический аппарат элодеи и оценка роли марганца как биогенного элемента в противодействии токсическим эффектам кадмия.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом модельных исследований была элодея канадская (*Elodea canadensis* Michx.). Это многолетнее водное растение с погруженными в воду длинными ветвистыми стеблями. Данный вид занесен из Северной Америки, распространен повсеместно.

Исследования проводили на побегах элодеи, предварительно культивируемой в лабораторных условиях на 5 % среде Хогланда–Арнона I (1 л среды содержал 41 мг безводного $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 25 мг KNO_3 , 6,8 мг KH_2PO_4 , 12 мг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Фотопериод составлял 16 : 8, температура 25 °C : 22 °C (день : ночь соответственно), интенсивность освещения – 150 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. В опытные варианты добавляли сульфаты кадмия и марганца (раздельно и совместно) в концентрации 100 мкмоль. Побеги элодеи длиной 10–15 см инкубировали в течение 5 сут. Контролем служил вариант без добавления металлов. По окончании опыта растения извлекали и тщательно промывали 0,01 % раствором Na-ЭДТА и дистиллированной водой.

Содержание тяжелых металлов в листьях элодеи определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (AAS Vario 6, «Analytik Jena», Germany) после мокрого озоления 70 % азотной кислотой особой чистоты [18].

Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов определяли спектрофотометрически на Jasco V-650 («Jasco Inc.», США) в ацетоновых экстрактах (80 %). Для этого навеску листьев (30 мг) гомогенизировали в охлажденном 80 % ацетоне и центрифугировали 10 мин при 5000 g. Расчет содержания хлорофиллов и каротиноидов проводили по Н. Lichtenthaler [19].

Параметры переменной флуоресценции хлорофилла устанавливали с помощью импульсного флуориметра РАМ 210 («Walz», Германия), руководствуясь инструкцией производителя [20]. Перед измерением флуоресценции листья выдерживали в темноте в течение 15 мин для минимизации тушения флуоресценции. Показатель F_v/F_m определяли для оценки максимального квантового выхода фотохимии фотосистемы II. Эта величина представляет отношение переменной флуоресценции хлорофилла F_v к максимальному уровню F_m (F_v/F_m) [20].

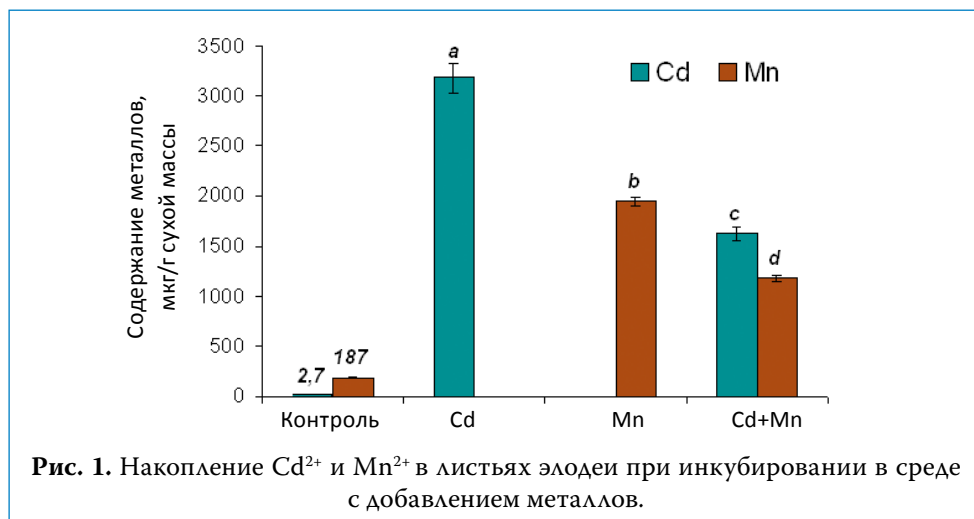
Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Excel 7,0 и Statistica 6,0. Достоверность различий между вариантами

определяли по непараметрическому критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. На рисунках показаны средние арифметические значения из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки (буквами обозначены достоверно значимые различия между вариантами).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Накопление металлов

При инкубировании элодеи в течение 5 сут в среде с ионами кадмия его содержание в листьях возросло более чем в 1000 раз по сравнению с контролем (рис. 1). При этом растения сохраняли жизнеспособность. Такой высокий уровень аккумуляции металла, вероятно, связан с тем, что элодея канадская является погруженным водным растением, имеющим высокие сорбционные свойства стеблей и листьев. При инкубировании растений в среде с Mn^{2+} его содержание в листьях также увеличивалось, но не столь значительно, как в случае с кадмием (примерно в 10 раз). Это объясняется тем, что исходное содержание в листьях марганца как биогенного элемента было почти в 70 раз выше, чем содержание кадмия.



При инкубировании растений в среде с одновременным добавлением металлов их содержание в листьях достоверно уменьшалось. В присутствии Mn^{2+} накопление Cd^{2+} было ниже почти в два раза, чем при раздельном внесении соли кадмия, в то время как содержание марганца в присутствии кадмия снижалось только на 40 %. Явление ингибирования процесса поглощения Cd^{2+} под действием Mn^{2+} показано и другими авторами на разных видах растений: люпине [7], проростках кукурузы [13], фитолакке костянковой [15], водорослях [17]. Имеются также данные о том, что в присутствии

кадмия в листьях многих растений (ячмень, пекинская капуста, горох) снижалось содержание марганца [1].

Таким образом, проведенные с использованием модельных систем исследования подтвердили данные многих авторов о том, что взаимоотношения между ионами кадмия и марганца носят антагонистический характер. Очевидно, это можно объяснить конкуренцией между изученными ионами за общие транспортеры, обеспечивающие их поступление в клетки растений [1, 7].

Содержание фотосинтетических пигментов и флуоресценция хлорофилла

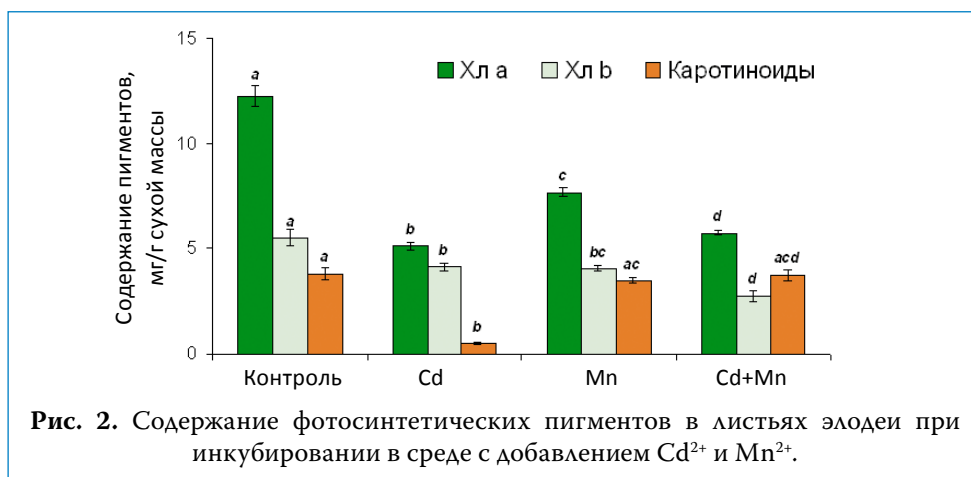
Фотосинтетический аппарат растений, функционирование которого определяется количеством фотосинтетических пигментов и их соотношением, достаточно чувствителен к воздействию неблагоприятных факторов. Изучение изменения содержания пигментов и их соотношения имеет большое значение при оценке устойчивости растений к стрессорам различной природы.

Под действием ионов кадмия у элодеи снижалось содержание всех фотосинтетических пигментов (рис. 2). Наибольший эффект кадмий оказал на хлорофилл *a* и каротиноиды, количество которых за период инкубирования уменьшалось в два с половиной и в четыре раза соответственно. Содержание хлорофилла *b* при этом снизилось примерно на 20 %.

Снижение количества фотосинтетических пигментов в условиях техногенно нарушенной среды часто объясняют их деградацией либо ингибированием синтеза в результате активации процессов свободнорадикального окисления. Главной причиной снижения содержания зеленых пигментов в присутствии тяжелых металлов является подавление синтеза хлорофилла, связанное, в первую очередь, с непосредственным ингибирующим действием металлов на активность ферментов биосинтеза [1].

Известно, что хлорофилл *a* входит в состав реакционных центров и светособирающих комплексов обеих фотосистем, в то время как хлорофилл *b* преимущественно является компонентом светособирающего комплекса фотосистемы II.

Из зеленых пигментов наиболее чувствительным к действию как кадмия, так и марганца оказался хлорофилл *a*. Тем не менее, Mn^{2+} подавлял его синтез в меньшей степени, чем Cd^{2+} . Совместное действие кадмия и марганца приводило к достоверному повышению содержания хлорофилла *a* по сравнению с раздельным внесением кадмия. Содержание хлорофилла *b* при сочетании Cd^{2+} и Mn^{2+} уменьшалось по сравнению как с контролем, так и при инкубации растений в среде с добавлением металлов по отдельности. Количество каротиноидов в листьях элодеи при сочетании двух металлов в среде оставалось на уровне контроля.



Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что присутствие марганца снижало токсическое действие кадмия на хлорофилл *a* и каротиноиды, в то время как хлорофилл *b*, очевидно, подвергался разрушению: его содержание снижалось. Иными словами, в отношении хлорофилла *a* и каротиноидов между кадмием и марганцем наблюдался антагонистический, а в отношении хлорофилла *b* – синергический эффект.

Важным показателем напряженности энергетических процессов в хлоропластах является отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* и суммы хлорофиллов *a* и *b* к каротиноидам. Изменения в соотношении пигментов свидетельствуют о различных нарушениях в фотосинтетическом аппарате растений [21]. Результаты проведенных исследований показали, что в присутствии кадмия у элодеи отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* снижалось почти в два раза, а в присутствии марганца менее значительно – на 20 % (рис. 3а). Это свидетельствует о большей устойчивости хлорофилла *b* к действию кадмия по сравнению с хлорофиллом *a*. При совместном действии металлов соотношение хлорофиллов оставалось примерно на уровне контроля. Вместе с тем, отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам в листьях элодеи в присутствии кадмия увеличивалось в четыре раза по сравнению с контролем как результат резкого снижения количества каротиноидов (рис. 3б). Это может быть связано с тем, что каротиноиды выполняют широкий спектр функций в растительном организме, в т. ч. и антиоксидантную, реализация которой сопряжена с окислением этих пигментов.

Информативным показателем стресса у растений при изучении воздействия различных экологических факторов является изменение оптических свойств хлорофилла. Действие многих стрессовых факторов, в т. ч. и тяжелых металлов, на растения сопряжено с влиянием на состояние реакцион-

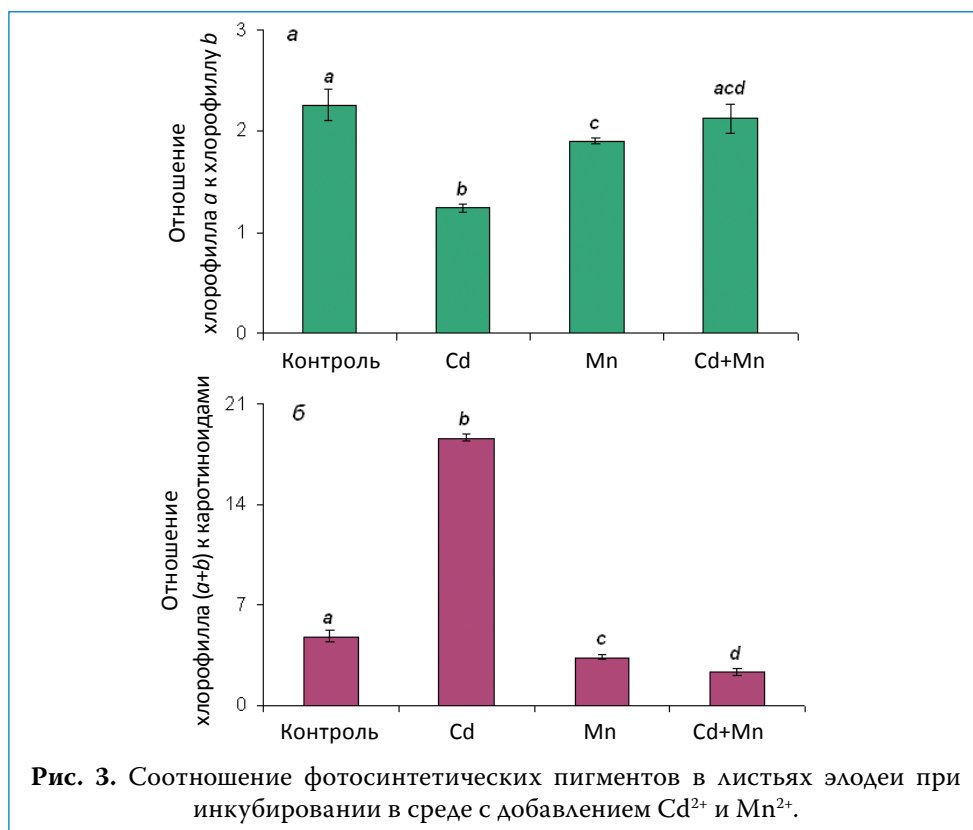
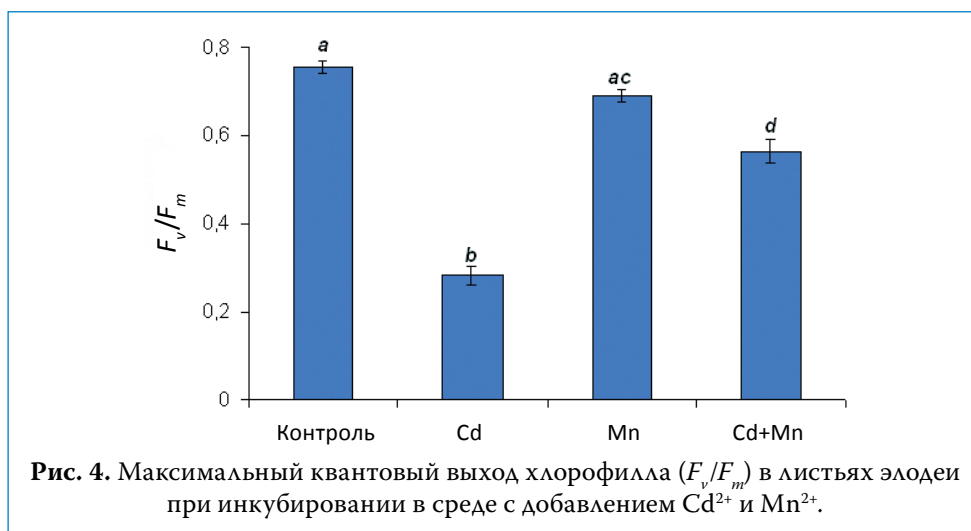


Рис. 3. Соотношение фотосинтетических пигментов в листьях элодеи при инкубировании в среде с добавлением Cd^{2+} и Mn^{2+} .

ного центра фотосистемы II, о котором можно судить по уровню флуоресценции. Существует обратное соотношение между уровнем флуоресценции и интенсивностью фотохимических реакций [22]. Для оценки состояния фотосинтетического аппарата часто используют величину максимального квантового выхода фотохимии фотосистемы II.

В водных экосистемах различные антропогенные загрязнения могут оказывать угнетающее влияние на фотосинтетический аппарат макрофитов, что в итоге уменьшает продуктивность гидроценозов [23]. В последние годы измерение параметров флуоресценции хлорофилла широко используется для мониторинга воздействий на водные макрофиты, особенно на водоросли. В рамках данного исследования предпринята попытка оценить изменение квантового выхода при действии тяжелых металлов на высшие водные растения.

У листьев элодеи в контрольной модельной системе величина максимального квантового выхода была немного ниже теоретически возможной (0,85) [20] и составляла 0,78 (рис. 4).



Под действием кадмия происходило резкое снижение переменной флуоресценции хлорофилла: максимальный квантовый выход уменьшался в 2,4 раза. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными [16], и данными других авторов [24]. Очевидно, Cd^{2+} , как металл с высокой токсичностью, вызывал конформационные изменения белковых молекул, входящих в состав реакционного центра фотосистемы II. Присутствие марганца в среде не оказало достоверно значимого влияния на параметры флуоресценции. Совместное действие ионов на элодею приводило к снижению величины квантового выхода хлорофилла по сравнению с контролем. Однако показатель F_v/F_m в этом варианте опыта в два раза превышал его значение в случае присутствия в среде только ионов кадмия.

Проведенные модельные исследования показали, что взаимное действие на элодею изученных металлов носило, как правило, антагонистический характер. Присутствие в среде Mn^{2+} существенно снижало токсическое действие Cd^{2+} на фотосинтетический аппарат элодеи, что, главным образом, объясняется ингибированием процесса поглощения ионов кадмия.

ВЫВОДЫ

В рамках проведенного исследования выявлено, что при совместном присутствии в среде солей кадмия и марганца накопление Cd^{2+} в листьях элодеи канадской уменьшалось почти в два раза по сравнению с его раздельным внесением, в то время как накопление Mn^{2+} – лишь на 40 %.

Инкубирование элодеи в среде с добавлением ионов металлов приводило к уменьшению количества фотосинтетических пигментов. Под действием кадмия у элодеи снижалось содержание как хлорофиллов, так и

каротиноидов, в то время как марганец не оказывал влияния на содержание последних.

Наличие в среде ионов марганца существенно ослабляло токсический эффект кадмия. Содержание хлорофилла *a*, каротиноидов и фотохимическая эффективность фотосистемы II снижались в меньшей степени, чем при отдельном действии этого иона. Очевидно, это обусловлено ингибированием процесса поглощения Cd^{2+} в присутствии Mn^{2+} .

Авторы благодарят профессора К. Strzałka и доктора А. Waloszek за предоставленную возможность измерения параметров переменной флуоресценции хлорофилла на базе кафедры физиологии и биохимии растений факультета биохимии, биофизики и биотехнологии Ягеллонского университета (г. Краков, Польша).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 638 с.
2. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 439 с.
3. Ouzounidou G., Moustakas M., Eleftheriou E. P. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves // Environ. Contamin. Toxicol. 1997. Vol. 32. No 2. P. 154–160.
4. Серёгин И.В., Иванов В.Г. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиол. раст. 2001. Т. 53. № 4. С. 606–630.
5. Uradhuay R.K. Metal stress in plants: its detoxification in natural environment // Braz. J. Bot. 2014. Vol. 37. P. 377–382.
6. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. London: Academic Press, 1995. 889 p.
7. Nazar R., Iqbal N., Masood A., Iqbal M., Khan R., Syeed S., Khan N.A. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation // American J. Plant Sci. 2012. Vol. 3. P. 1476–1489.
8. Mishra V.K., Tripathi B.D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes // Biores. Technol. 2008. Vol. 99. P. 7091–7097.
9. Shamsi I.H., Wei K., Jilani G., Zhang G. Interactions of cadmium and aluminum toxicity in their effect on growth and physiological parameters in soybean // J. of Zhejiang Univ. Sci. 2007. Vol. 8. No 3. P. 181–188.
10. Ducic T., Polle A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants // Braz. J. Plant Physiol. 2005. Vol. 17. No 1. P. 103–112.
11. Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*) // Plant Physiol. Biochem. 2007. Vol. 45. No 1. P. 62–69.
12. Aravind P., Prasad M.N.V. Cadmium-induced toxicity reversal by zinc in *Ceratophyllum demersum* L. (a free floating aquatic macrophyte) together with exogenous supplements of amino- and organic acids // Chemosphere. 2005. Vol. 61. P. 1720–1733.

13. *Palove-Balang P., Kisova A., Pavlovkin J., Mistrik I.* Effect of manganese on cadmium toxicity in maize seedlings // *Plant Soil Environ.* 2006. Vol. 4. P. 143–149.
14. *Siedlecka A.* Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients // *Acta Soc. Botanicor. Poloniae.* 1995. Vol. 64. No 3. P. 265–272.
15. *Liu H., Zhang Y., Chai T., Wang J., Feng S., Liu G.* Manganese-mitigation of cadmium toxicity to seedling growth of *Phytolacca acinosa* Roxb. is controlled by the manganese-cadmium molar ratio under hydroponic conditions // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 73. P. 144–153.
16. *Maleva M.G., Nekrasova G.F., Borisova G.G., Chukina N.V., Ushakova O.S.* Effect of heavy metals on photosynthetic apparatus and antioxidant status of *Elodea* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. Vol. 59. No 2. P. 190–197.
17. *Rebhun S., Ben-Amotz A.* Antagonistic effect of manganese to cadmium toxicity in the alga *Dunaliella salina* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1988. Vol. 42. P. 97–104.
18. *Ермаченко Л.А., Ермаченко В.М.* Атомно-абсорбционный анализ с графитовой пещью. М.: Изд-во ПАИМС, 1999. 220 с.
19. *Lichtenthaler H.* Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes // *Meth. Enzymol.* 1987. Vol. 148. P. 350–382.
20. *Schreiber U.* Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion: simple introductory experiments with the teaching-pam chlorophyll fluorometer. Heinz Walz GmbH, Germany, 1997. 73 p.
21. *Попова И.А., Маслова Т.Г., Попова О.Ф.* Особенности пигментного аппарата растений различных ботанико-географических зон // *Эколого-физиологические исследования фотосинтеза и дыхания растений.* Л.: Наука, 1989. С. 115–129.
22. *Лысенко В.С., Вардуни Т.В., Сойер В.Г., Краснов В.П.* Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода // *Фундамент. исслед.* 2013. № 4. С. 112–120.
23. *Рубин А.Б.* Биофизические методы в экологическом мониторинге // *Соросовский образоват. журнал.* 2000. Т. 6. № 4. С. 7–13.
24. *Atal N., Saradni P. P., Mohanty P.* Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium: analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield // *Plant Cell Physiol.* 1991. Vol. 32. No 7. P. 943–951.

Сведения об авторах:

Малева Мария Георгиевна, канд. биол. наук, доцент, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Институт естественных наук, Россия, 620000, Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: maria.maleva@mail.ru

Чукина Надежда Владимировна, канд. биол. наук, доцент, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Институт естественных наук, 620000, Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: nady_dicusar@mail.ru

Борисова Галина Григорьевна, д-р геогр. наук, профессор, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина», Институт естественных наук, 620000, Екатеринбург, пр. Ленина, 51; e-mail: Borisova59@mail.ru