

ORIGINAL ARTICLE

**THE INFLUENCE OF CADMIUM CHLORIDE ON FATTY
ACID COMPOSITION OF HIGH AQUATIC PLANTS FROM
ANGARA RIVER**

Kirichenko K.A.¹, Pobezhimova T.P., Sokolova N.A., Dudareva L.V.,
Voinikov V.K.

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy
of Sciences, Lermontova st., 132, Irkutsk, 664033 Russia*

¹ E-mail : kuzma@sifibr.irk.ru

Received February 11, 2011

The comparative analysis of the fatty acid content in *Myriophyllum spicatum* L. and *Elodea canadensis* Michx. has been carried out during 24 hours of the treatment with 0,05 M cadmium chloride. Changes in a fatty acids composition in response to toxic influence have been shown. The differences in change dynamics of the fatty acids content under the treatment with cadmium chloride have been detected in investigated species.

Key words: Elodea canadensis, Myriophyllum spicatum, high aquatic plants, Baikalian region, cadmium chloride, fatty acids.

ORIGINAL ARTICLE

**ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КАДМИЯ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ
СОСТАВ ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ РЕКИ АНГАРА**

Кириченко К.А.¹, Побежимова Т.П., Соколова Н.А., Дударева Л.В.,
Войников В.К.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН,
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия

¹ Тел. (3952)42-46-59 E-mail: kuzma@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 11 Февраля 2011

Проведён сравнительный анализ содержания жирных кислот в тканях *Myriophyllum spicatum* L. и *Elodea canadensis* Michx. в условиях воздействия 0,05 М раствора хлорида кадмия в течение 24 часов. Показаны изменения в составе жирных кислот в ответ на воздействие токсиканта. Выявлены отличия в динамике изменения содержания жирных кислот под воздействием хлорида кадмия у исследованных видов.

Ключевые слова: *Myriophyllum spicatum*, *Elodea canadensis*, высшие водные растения, байкальский регион, хлорид кадмия, токсическое воздействие, жирные кислоты.

Кадмий относится к группе тяжёлых металлов, обладает значительной токсичностью, подвижностью, проницаемостью и способностью к накоплению в тканях живых организмов. Поступает в водоёмы со стоками предприятий горнодобывающей, обогатительной и электролизной промышленности, а также с сельскохозяйственных полей при использовании удобрений. Особенно значительное влияние кадмий оказывает на организмы, обитающие в

водоёмах с низкой минерализацией или пониженными значениями pH (Квеситадзе, 2005; Кузнецова и др., 2008; Моисеенко, 2009).

Неудовлетворительное качество воды является причиной почти 80% всех заболеваний в мире. Состав природных вод формируется под влиянием абиотических факторов и биоты водоёмов. В последнее время всё большее влияние на состав воды многих водоёмов

оказывают антропогенные факторы (Раткович, 2003; Фаинс и др., 2007; Бреховских и др., 2008).

Высшие водные растения являются первопродуцентами в водных экосистемах, принимают участие в обмене биогенных элементов, самоочищении воды, способны накапливать и трансформировать поллютанты. Они используются при биоиндикации и биотестировании состояния водоёмов. Однако недостаточность сведений по экологии и физиологии большинства видов макрофитов ограничивает возможности для их использования в качестве индикаторных видов (Садчиков, Кудряшов, 2005; Бреховских и др., 2008; Кокин, 1982; Егоркина, 2000; Мелихова и др., 2008).

В водоёмах байкальского региона сосредоточены значительные запасы пресных вод, только в озере Байкал содержится до 20% её мировых запасов. Сток воды из озера осуществляется только через реку Ангара. Флора и фауна озера Байкал, его водосборного бассейна и реки Ангара содержит в себе значительное разнообразие эндемичных таксонов, а также ряд широко распространённых видов. Гидрохимические и гидрофизические условия характеризуются высоким содержанием кислорода, низкой минерализацией и температурой (Тимошкин и др., 2001; Ижболдина, 2007; Тахтеев и др., 2009). При разработке методов биологической оценки состояния водоёмов байкальского региона, стоит учитывать специфику их биотических и абиотических особенностей.

Под воздействием факторов окружающей среды происходят изменения в липидном и жирнокислотном составе мембран растений. Метаболизм липидов тесно связан с дыханием,

фотосинтезом, стрессовой реакцией и другими физиологическими процессами. Сравнительное изучение липидного и жирнокислотного состава гидробионтов позволяют выявить нарушения ещё до проявления морфологических и популяционных изменений (Чиркова, 1997; Розенцвиг и др., 1999; Верещагин, 2005; Ипатова, 2005).

Целью исследования было изучить и сравнить относительный состав жирных кислот общих липидов наиболее массовых видов высших водных растений реки Ангара при воздействии хлорида кадмия.

Материалы и Методы:

Макрофиты: *Elodea canadensis* Michx. и *Myriophyllum spicatum* L. собирались в верхнем течении реки Ангара на левом берегу стандартными методами гидрботаники в июле – сентябре 2009 г., средняя температура воды при вылове составляла 10–12°C. После вылова растения промывались проточной водой для избавления от эпифитов, разделялись по видам и содержались 14–30 дней в аквариумах при постоянной аэрации и замене ½ объёма воды каждые 2–4 дня. Воду для содержания растений брали из реки Ангара. Температура содержания в лабораторных условиях составляла 19–20°C, фотопериод 16 ч. Источником света служили флуоресцентные фито-лампы Sylvania F18W/GRO (Германия) с максимумами выделения в красной и синей областях спектра (отношение интенсивности излучения красного света к интенсивности излучения синего 1,42). Интенсивность освещения 1000 лк.

Оба вида относятся к цветковым – Magnoliophyta. *Elodea canadensis* многолетнее, погружённое в воду, слабоукореняющееся, двудомное растение семейства Водокрасовых,

класса Liliopsida. В Евразию занесены только женские растения. *Myriophyllum spicatum* – многолетнее корневищное растение с прямыми, ветвистыми, погружёнными в воду стеблями, относится к семейству Сланоягодниковые, классу Magnoliopsida (Азовский, Чепинога, 2007).

После культивирования растения экспериментальной группы помещали в 0,05 М раствор хлорида кадмия на 24 ч. Для анализа отбиралась усреднённая проба биомассы, состоящая из нескольких побегов целиком (стебель с листьями) весом 1 г. Растения промывались щеточками с мягким ворсом в проточной воде, для избавления от эпифитов. Навеску растительного материала фиксировали жидким азотом и растирали в фарфоровой ступке до получения гомогенной массы. Липиды экстрагировали смесью хлороформ:метанол (2:1) (Bligh, Dyer, 1959). Хлороформ из липидного экстракта удаляли под вакуумом с помощью роторного испарителя ИР-1ЛТ, Labtex (Россия). Для получения метиловых эфиров жирных кислот к экстракту суммарных липидов после удаления растворителя добавляли 5% метанольный раствор H_2SO_4 и нагревали на водяной бане при 60°C в течение 30 минут. Метиловые эфиры жирных кислот, после охлаждения, трижды экстрагировались гексаном (Christie, 1993). Дополнительную очистку метиловых эфиров жирных кислот проводили методом ТСХ на алюминиевых пластинках с силикагелем Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) в камере с бензолом. Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS Agilent Technologies

(США). Детектор – масс-спектрометра – квадруполь, способ ионизации электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX, (30м × 250 мкм × 0,50 мкм). Неподвижная фаза – полиэтиленгликоль. Подвижная фаза: гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280°C. Диапазон сканирования 41-450 а.е.м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, разделение потоков 5:1. Хроматографирование выполняли в изократическом режиме при 200°C. Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили с помощью расчета эквивалентной длины алифатической цепи (ECL). Кроме этого использовали библиотеки масс-спектров NIST 05, Christie, а также сравнение времени удерживания со временами удерживания стандартных соединений. Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах от общего их содержания в исследуемом образце. Для оценки степени ненасыщенности жирных кислот рассчитывали индекс двойной связи (ИДС), как сумму произведений весовых процентов каждой ненасыщенной кислоты на число двойных связей в её молекуле, делённую на 100, согласно методу, предложенному Lyons с соавт. (Lyons et al., 1964).

Достоверность различий оценивали с помощью *T*-критерия Манна-Уитни (Гланц, 1998).

Результаты:

Как видно из таблицы у исследованных видов на кислоты с длиной цепи 16 и 18 атомов углерода приходилось более 95%. Данная особенность не является уникальной и характерна для многих систематических групп живых организмов, в том числе и для высших растений, так как преимущественно 16-ти и 18-ти углеродные жирные кислоты образуют основу клеточных мембран (Гудвин, Мерсер, 1986; Gunstone, 1996; Napolitano, 1998). У исследованных видов в составе липидов содержится меньше насыщенных жирных кислот, чем ненасыщенных.

Экспозиция исследованных видов в 0,05 М растворе хлорида кадмия в течение 24-х ч приводила к изменению в составе жирных кислот их тканей. Соотношение суммарных долей ненасыщенных и насыщенных жирных кислот менялось под воздействием хлорида кадмия. Насыщенных кислот становилось больше, их суммарное содержание увеличилось с 20% до 21% у *M.spicatum* и с 25% до 29% у *E. canadensis*.

Под воздействием хлорида кадмия происходило увеличение содержания всех насыщенных жирных кислот у *M.spicatum*, кроме гептадекановой кислоты (C17:0), чьё содержание, напротив, снижалось и арахидоновой кислоты (C20:0), её доля не изменялась. Однако у *M. spicatum* достоверное увеличение содержания, по сравнению с контролем, выявлено только для миристиновой (C14:0) и пентадекановой (C15:0) кислот. Ненасыщенных жирных кислот у данного вида становилось больше, исключение составили линолевая (C18:2 ω 6) и гондоиновая (C20:1 ω 9) кислоты, тем не менее, статистически достоверных изменений

в содержании ненасыщенных жирных кислот не выявлено. Перераспределение относительного содержания насыщенных, моно- и полиненасыщенных жирных кислот у *M. spicatum* не сказывалось на значении индекса двойной связи.

Относительное содержание жирных кислот *E. canadensis* менялось иным образом, чем у *M. spicatum*. Увеличивалось содержание всех кислот, кроме α -линоленовой (C18:3 ω 3), но достоверно только пентадекановой (C15:0), стеариновой (C18:0) и арахидоновой (C20:0). Содержание же α -линоленовой кислоты (C18:3 ω 3) достоверно снижалось по сравнению с контролем. Изменения массовых долей жирных кислот *E. canadensis* приводило к снижению индекса двойной связи, однако данное изменение не носило статистически достоверного характера.

Таким образом, можно констатировать, что под воздействием 0,05 М хлорида кадмия в течение 24 ч состав жирных кислот меняется у исследованных видов по-разному. Менее выражены эти изменения у *M. spicatum*, по сравнению с *E. canadensis*. В целом, состав жирных кислот *M. spicatum* оказался более стабильным к воздействию токсиканта.

Обсуждение:

Известно, что кадмий является токсичным, накапливаясь в тканях организмов, не подвергается биодegradации и практически не выводится из организма. Показано, что тяжёлые металлы, в том числе кадмий снижают рост растений, негативно сказываются на их развитии, нарушают процессы транспорта ассимилятов и минерального питания, влияют на водный и гормональный обмен, снижают активность фотосинтеза и дыхания (Кузнецова и

др., 2008; Гармаш, Головки, 2009; Колесниченко, с воздействием кадмия на процессы жизнедеятельности и метаболизм липидов в жирных кислот у исследованных видов связаны частности.

Таблица. Состав (% весовой) жирных кислот общих липидов высших водных растений в контроле и после воздействия 0,05M CdCl₂.

	<i>M.spicatum</i>	<i>M.spicatum</i>	α	<i>E.canadensis</i>	<i>E.canadensis</i>	α
	кон.	24 ч CdCl ₂		кон.	24 ч CdCl ₂	
C14:0	0,34±0,04	0,56±0,14	0,032	0,54±0,24	0,62±0,14	нет
C15:0	0,08±0,02	0,18±0,05	0,016	0,14±0,04	0,32±0,11	0,032
C16:0	17,30±1,93	18,17±2,72	нет	20,00±1,89	22,15±2,92	нет
C17:0	0,27±0,11	0,18±0,03	нет	0,56±0,09	0,78±0,21	нет
C18:0	1,23±0,60	1,54±0,56	нет	2,66±0,67	4,06±0,76	0,032
C20:0	0,14±0,07	0,14±0,07	нет	0,33±0,11	0,48±0,11	0,063
C21:0	-	-	нет	0,14±0,02 ¹	0,15±0,04	нет
C22:0	0,21±0,08 ¹	0,22±0,05 ²	нет	0,37±0,16	0,50±0,21	нет
∑ C16:1*	0,71±0,14	0,83±0,19	нет	1,65±0,73	1,75±0,64	нет
∑ C18:1**	2,75±0,81	2,99±1,41	нет	1,90±0,69	2,40±0,85	нет
C18:2ω6	28,02±4,36	23,94±1,20	нет	18,04±3,09	18,99±0,94	нет
C18:3ω3	47,84±7,61	50,65±6,02	нет	53,51±4,08	47,35±4,96	0,063
C20:1ω9	0,22±0,09 ¹	0,15±0,07	нет	0,06±0,01 ²	0,07±0,01 ³	нет
ИДС	2,03±0,14	2,04±0,15	нет	2,00±0,10	1,84±0,14	нет

Приведено среднее значение ± стандартное отклонение, n = 5 для контрольной выборки и n = 4 для экспериментальной; «1» – n = 4; «2» – n = 3; «3» – n = 2; * – сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; ** – сумма олеиновой и *цис*-вакценовой кислот; α – уровень значимости при сравнении экспериментальной выборки с контрольной; «нет» – статистически достоверных отличий не выявлено, «-» кислота не обнаружена.

Одним из механизмов токсического действия тяжелых металлов и, в частности, кадмия является его соединение с SH-группами белков и инициация перекисного и свободнорадикального окисления. Под воздействием тяжёлых металлов нарушаются функции мембран, показателем их трансформации служат изменения в составе жирных кислот. Жирные кислоты, будучи составным компонентом мембранных липидов,

влияют на физико-химические свойства мембран, от которых, в свою очередь, зависят многие физиологические процессы. Выполняя свои барьерные функции, мембраны представляют собой первичную мишень и являются первым рубежом на пути загрязняющих веществ. В ряде работ предлагается считать изменения состава жирных кислот липидов неспецифической реакцией.

Неспецифичность проявляется в увеличении ненасыщенности в ответ на воздействие разных стрессоров. Однако показано, что под воздействием тяжелых металлов увеличивается количество насыщенных жирных кислот, что делает упаковку мембранных липидов более плотной и тем самым стабилизирует мембраны и уменьшает их проницаемость (Чиркова, 1997; Холодова и др., 2005; Кузнецова и др., 2008; Колесниченко, 2009; Нестеров и др., 2009; Ху и др., 2009). Изменения жирнокислотного состава у исследованных видов под воздействием хлорида кадмия были выражены в разной степени. Можно предположить, что действие токсиканта на метаболизм липидов каждого вида имеет свои особенности. Мембраны *E. canadensis*, вероятно, подвергаются более глубоким модификациям, так как у данного вида происходит достоверное снижение содержания линоленовой кислоты (C18:3 ω 3). Снижение доли этой кислоты, возможно, может быть обусловлено активацией перекисного окисления липидов, снижением активности дыхания или совместным влиянием обоих факторов. У данного вида, также достоверно увеличивается содержание пентадекановой (C15:0), стеариновой (C18:0) и арахидиновой (C20:0) кислот. Жирнокислотный состав *M. spicatum* остаётся более стабильным, и, вероятно, метаболизм липидов в меньшей степени подвержен влиянию хлорида кадмия. Известно, что данный вид рекомендован для фиторемедиации от загрязнения тяжёлыми металлами, в том числе кадмием (Квеситадзе и др., 2005). Таким образом, нами установлено, что у исследованных растений изменение состава жирных кислот в ответ на токсическое воздействие 0,05 М хлорида кадмия является видоспецифическим. В связи с этим, выявленные

биохимические отличия стоит учитывать при разработке методов оценки качества и очистки загрязнённой воды.

Литература:

- Азовский, М.Г., Чепинога, В.В. (2007) *Высшие водные растения озера Байкал*. Иркутск: Изд-во Иркутского гос. ун-та. 157 с.
- Бреховских, В.Ф., Казмирук, В.Д., Вишневецкая, Г.Н. (2008) *Биота в процессах массопереноса в водных объектах*. М.: Наука, 315 с.
- Верещагин, А.Г. (2005) Хроника. Шестнадцатый международный симпозиум по липидам растений (1-4 июня 2004 г., Будапешт, Венгрия). *Физиология растений*. Т. 52. № 3. 467–474.
- Гармаш, Е.В., Головкин, Т.К. (2009) Влияние кадмия на рост и дыхание ячменя при двух температурных режимах выращивания. *Физиология растений*. Т. 56. № 3. 382-387.
- Гланц, С. (1998) *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика. 459 с.
- Гудвин, Т., Мерсер, Э. (1986) *Введение в биохимию растений*. В 2-х т. Т.1. М.: Мир. 393 с.
- Егоркина, Г.И., Зарубина, Е.Ю., Кириллов, В.В. (2000) Использование высших водных растений для оценки генотоксичности поверхностных вод. *Сибирский экологический журнал*. Вып. 6. 685–688.
- Ижболдина, Л.А. (2007) *Атлас и определитель водорослей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо- и макрофиты) с краткими очерками по их экологии*. Новосибирск.: Изд-во «Наука-Центр». 248 с.

- Ипатов, В.И. (2005) *Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды*. М.: Изд-во «Графикон-принт». 224 с.
- Квеситадзе, Г.И., Хатисашвили, Г.А., Садунишвили, Т.А., Евстигнеева, З.Г. (2005) *Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях*. М.: Наука. 199 с.
- Колесниченко, В.В. (2009) Изучение влияния разных концентраций кадмия на этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum L.*) и рапса (*Brassica napus*). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. V. 5. № 1-2. 16-31.
- Кузнецова, Т.Ю., Ветчинникова, Л.В., Титов, А.Ф., Ильинова, М.К. (2008) Влияние кадмия на состав жирных кислот липидов в побегах карельской берёзы *in vitro*. *Физиология растений*. Т. 55. № 5. 731-737.
- Кокин, К.А. (1982) *Экология высших водных растений*. М.: Изд-во МГУ. 160 с.
- Мелихова, О.П., Сарапульцева, Е.И. и др. (2008) *Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / под ред. Мелиховой О.П., Сарапульцевой Е.И.* М.: Издательский центр «Академия». 288 с.
- Моисеенко, Т.И. (2009) *Водная экотоксикология: теоретические и прикладные аспекты*. М.: Наука. 400 с.
- Нестеров, В.Н., Розенцвет, О.А., Мурзаева, С.В. (2009) Изменение состава липидов у пресноводного растения *Hydrilla verticillata* при накоплении и удалении из тканей ионов тяжелых металлов. *Физиология растений*. Т. 56. № 5. 97-106.
- Раткович, Д.Я. (2003) *Актуальные проблемы водообеспечения*. М.: Наука. 352 с.
- Розенцвет, О.А., Козлов, В.Г., Дембицкий, В.М. (1999) Сравнительное изучение липидов четырёх доминирующих видов растений и водорослей реки Шульган. *Биохимия*. Т. 64. Вып. 11. 1527-1535.
- Садчиков, А.П., Кудряшов, М.А. (2005) *Гидробиология: Прибрежно-водная растительность*. М.: Издательский центр «Академия». 240 с.
- Тахтеев, В.В. и др. (2009) *Биота водоёмов Байкальской рифтовой зоны*. Отв. ред. Плешанов, А.С. Иркутск.: Изд-во Иркутского гос. ун-та. 231 с.
- Тимошкин, О.А. и др. (2001) *Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна*: в 2 томах, том I, кн. 1 / отв. ред. Тимошкин О.А. Новосибирск.: Наука. 832 с.
- Фаинс, Д., Максимов, В.Н., Моричи, Дж., Назелли-Флорес, Л. (2007.) *Мультимедийный словарь по экологии*. М.: Наука. 183 с.
- Холодова, В.П., Волков, К.С., Кузнецов, Вл.В. (2005) Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации. *Физиология растений*. Т. 52. № 6. 848-858.
- Ху, Ж.Ц., Пей, Д.Л., Лиан, Ф., Ши, Г.С. (2009) Влияние загрязнения воды кадмием на рост растений *Sagittaria sagittifolia*. *Физиология растений*. Т. 56. № 5. 759-767.

- Чиркова, Т.В. (1997) Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям. *Соросовский Образовательный Журнал*. № 9. с. 12–17.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* V. **37**. p. 911–919.
- Christie, W.W. (1993) Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // *Advances in lipid methodology – Two* / Ed. Christie, W.W. Dundee: Oily Press, pp. 69–111.
- Gunstone, F.D. (1996) *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. London.: Blackie Academic and Professional. 252 p.
- Lyons, J.M., Wheaton, T.A., Pratt, H.K. (1964) Relationship between the Physical Nature of Mitochondrial Membranes and Chilling Sensitivity in Plant. *Plant Physiology*. V. **39**. P. 262–268.
- Napolitano G.E. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems // *Lipids in freshwater ecosystems* / Eds. Arts M.T., Wainman B.C. New York: Springer, 1998. pp. 21–25.