

СОПРЯЖЕННОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ С СОДЕРЖАНИЕМ ХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ОВСЯНИЦЫ ТРОСТНИКОВОЙ *Festuca arundinacea* SCHREB. В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕДЕЛЬНЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

© 2023 г. Е. Г. Тюлькова*, @, Г. Е. Савченко**, Л. Ф. Кабашникова**

*Гомельский государственный медицинский университет, ул. Ланге, 5, Гомель, 246000 Беларусь

**Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
ул. Академическая, 27, Минск, 220072 Беларусь

@E-mail: tut-3@mail.ru

Поступила в редакцию 01.06.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Изучали связь деградации мембраносвязанного хлорофилла с изменениями скоростей темнового дыхания и фотосинтеза в листьях *Festuca arundinacea* Schreb. под действием различных концентраций предельных и ароматических углеводородов, присутствующих в техногенных выбросах. Через 1 сут после интоксикации обнаружена тесная отрицательная корреляционная взаимосвязь между содержанием бесфитольных форм пигментов и скоростью фотосинтеза и положительная — между содержанием: 1) фитольных форм и скоростью фотосинтеза; 2) бесфитольных форм и скоростью дыхания. Взаимосвязи между процессами изменялись через 3 сут, характеризуя детоксицирующие и адаптационные способности растений.

Ключевые слова: овсяница тростниковая, углеводороды, фотосинтез, дыхание, фитольные и бесфитольные формы хлорофиллов

DOI: 10.31857/S1026347022600480, EDN: ESTKYP

Одна из задач экологии — исследование последствий влияния техногенных токсичных соединений на живые организмы. Значительный объем в выбросах современных промышленных предприятий приходится на долю летучих и нелетучих токсичных предельных и ароматических углеводородов — пентана, гексана, бензола, бутилацетата, о-ксилола и бенз(а)пирена. Важная роль в детоксикации этих веществ принадлежит растениям, прежде всего, как объектам фитотехнологий, выступающим в роли своеобразной фильтрационной системы, способствующей снижению токсического действия загрязнителей. Для этой цели оказались пригодными некоторые комнатные декоративные растения, эффективно и быстро поглощающие бензол, толуол, этилбензол, ксилол из воздуха закрытых помещений (Mosaddegh *et al.*, 2014). С другой стороны, при мониторинге состояния объектов окружающей среды все большую актуальность приобретает разработка эффективных методов оценки загрязнений с помощью растений, выступающих в роли биоиндикаторов.

Известно, что одной из наиболее уязвимых мишеней растительной клетки является фотосинтетический аппарат (Гудвин, Мерсер, 1986; Тюлькова и др., 2021), участвующий в образовании органических соединений из углекислого газа и воды с использованием энергии солнечного света в процессе фотосинтеза (Гудвин, Мерсер, 1986) — главного источника атмосферного кислорода. Экологическая направленность исследований фотосинтеза весьма разнообразна. Это — изучение воздействия тяжелых металлов (Zaouali *et al.*, 2020), ряда токсичных соединений или элементов (Kreslavski *et al.*, 2014; Jacotot *et al.*, 2018), питательных веществ (Singh, Reddy, 2015), климатических и других факторов (Акиншина и др., 2008; Kanchan *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2019; Икконен и др., 2020; Miao *et al.*, 2021; Ramazan *et al.*, 2021). В качестве информативного инструмента успешно используют флуоресцентные свойства стрессочувствительной фотосистемы 2 (ФС2) (Корнеев, 2002; Кабашникова, 2011; Тюлькова и др., 2021).

При исследовании механизмов стрессового ответа растений на различные воздействия, включая токсичные углеводороды разной хими-

Таблица 1. Растворимость углеводов в воде (Haynes *et al.*, 2014–2015) и их липофильность (Hansch *et al.*, 1995)

Соединение	Максимальные концентрации и дозы (300 ПДК, 50 мл)	Растворимость в воде, мг/100 мл	Липофильность, $\lg K_{o/w}$
Бутилацетат	0.26 μM (1.5 мкг)	830.0 (при 25°C)	1.82
Бензол	0.38 μM (1.5 мкг)	82.0 (при 16°C)	2.13
О-ксилол	0.57 μM (3.0 мкг)	15.0 (при 16°C)	3.12
Пентан	0.42 mM (1.5 мг)	36.0 (при 16°C)	3.39
Гексан	0.21 mM (0.9 мг)	14.0 мг (при 15°C)	3.9
Бенз(а)пирен	5.95 nM (7.5×10^{-2} нг)	<0.000162 (при 20°C)	6.04

ческой природы, большое значение придают активным формам кислорода (АФК) как продуктам окислительного стресса. Так, в листьях гороха обнаружено образование пероксида водорода под влиянием нафталина (Ланкин, 2016). Увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) показано в листьях овсяницы после обработки растений углеводородами (Тюлькова, Кабашникова, 2019). Усилением окислительного стресса сопровождалось и возрастание темнового дыхания на фоне снижения видимого фотосинтеза в результате действия аминолевулиновой кислоты на растения рапса (Аверина и др., 2019).

Данные последних лет указывают на возросший интерес к выяснению источников АФК при различных стрессах. Особое значение при этом придают продуктам деградации хлорофиллов. Известно, что при удалении из молекул хлорофилла жирорастворимого спирта фитола нарушается связь пигмент-белковых комплексов с фотосинтетической мембраной и их функционирование в процессе фотосинтеза. На примере активности ФС2 мы показали, что при действии на растение токсичных углеводов уровень тепловой диссипации избыточной энергии, поглощенной молекулами хлорофилла, рассматриваемый как защитный механизм, был пропорционален степени разрушения мембраносвязанных хлорофиллов (Тюлькова и др. 2022).

В продолжение этих исследований в настоящей работе изучено влияние углеводов, присутствующих в техногенных выбросах, непосредственно на параметры газообмена (поглощение и выделение кислорода) на фоне изменений содержания разных форм фотосинтетических пигментов на примере растений овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили растения одного из наиболее распространенных в городских условиях представителей многолетних травянистых растений — овсяницы тростниковой (*Festuca*

arundinacea Schreb.). В работе использовали выросшие в естественных условиях растения на стадии осеннего кущения (октябрь). Сначала их держивали в пластиковых контейнерах с грунтом при интенсивности освещения 120 мкмоль квантов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ и температуре 22°C в течение 4–5 ч. После такой непродолжительной адаптации к лабораторным условиям растения опрыскивали водными растворами токсических соединений разной концентрации. При выборе концентраций токсических веществ мы ориентировались на санитарные нормативы, действующие при оценке нагрузки загрязняющих веществ на окружающую среду и человека (Постановление, 2016).

Известно, что одним из основных путей загрязнений экосистем являются воздушные выбросы загрязняющих веществ, оседающих на поверхности почвы и растения. На этом основании в работе использовали распыляемые воздушно-капельным путем водные растворы, содержание углеводов в которых было эквивалентно установленным предельно допустимым концентрациям (ПДК) для каждого из них в атмосферном воздухе. В табл. 1 сопоставлены значения использованных максимальных доз углеводов (для каждого из них они соответствовали 300 ПДК для воздуха) с растворимостью соединений в воде и липофильностью (Hansch *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 2014–2015). Видно, что содержание углеводов при этих дозах было значительно ниже их растворимости в воде, что позволило готовить растворы с концентрациями 300 ПДК для каждого вещества и затем разбавлять их в 3 и 300 раз.

Материал анализировали через одни и трое суток после обработки соответствующими растворами углеводов, в течение которых растения выдерживали при температуре 22°C и интенсивности освещения 120 мкмоль квантов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ с фотопериодом 14 ч. Контролем служили растения, обработанные дистиллированной водой. Для всех анализов брали идентичные отрезки листа.

Общее содержание хлорофилловых пигментов в ацетоновых экстрактах из тканей листа определяли по спектрам поглощения (спектрофотометр

Shimadzu UV-2401 PC), используя для расчета коэффициенты, приведенные в работе (Lichenthaler, Buschmann, 2001). Разделение фитольных и бесфитольных форм хлорофиллов, основанное на их разной растворимости в гексане при соответствующих значениях pH, осуществляли по методике, описанной в работе (Harpaz-Saad *et al.*, 2007). Содержание всех пигментов в итоге пересчитывали на сырую массу. Измерения проводили в 3-кратной биологической повторности.

Активность темнового дыхания и фотосинтеза измеряли по скорости поглощения и выделения кислорода, соответственно, с помощью компьютеризированной системы PlantVital® 5030 (Руководство, 2008). Отрезок листа помещали в камеру прибора на электрод — кислородный сенсор (Sensortech Meinsberg, Германия) и сначала регистрировали скорость потребления кислорода в темноте, а затем — активность фотосинтеза по скорости выделения кислорода при освещении камеры. Скорости потребления и выделения кислорода (средние из 3-х повторностей) рассчитывали в $\text{мкмоль O}_2 \text{ c}^{-1} \text{ м}^{-2}$.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft). Степень взаимосвязи двух переменных оценивали с помощью коэффициента корреляции (r). Мету сходства в действии разных концентраций углеводов на исследуемые процессы определяли иерархическим кластерным анализом в программе Statistica ver. 12, используя для объединения данных метод Уорда, применяемый для задач с близко расположенными кластерами, а в качестве расстояния между кластерами — евклидово расстояние (приrost суммы квадратов расстояний объектов до центра кластера) (Ward, 1963). Для определения тенденций изменения параметров исследованных процессов в зависимости от максимальной дозы и липофильности углеводов экспериментальные данные обрабатывали в программе Excel путем построения линий тренда, близость которых к фактическим данным оценивали по величине достоверности аппроксимации R^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественные различия в действии исследованных углеводов на темновое дыхание в листьях овсяницы показаны на рис. 1. При действии на растения однократной ПДК пентана через сутки после обработки скорость поглощения кислорода была выше наблюдаемой в контроле, а под влиянием гексана, бензола, о-ксилола и бутилацетата снижалась по мере увеличения содержания этих токсических веществ. В случае бенз(а)пирена эффективными были только высокие дозы — 100 и 300 ПДК. Через 3 сут после обработки бензолом,

бенз(а)пиреном и бутилацетатом скорость темнового дыхания превышала значения, наблюдавшиеся спустя 1 сут.

Скорость видимого фотосинтеза (рис. 2) под действием всех веществ, кроме пентана, через сутки после обработки снижалась по сравнению с контролем. Дозовая зависимость этого снижения была особенно выразительной в случае бензола и о-ксилола. При этом скорость истинного фотосинтеза, учитывающего количество кислорода, использованного на дыхание, также снижалась по мере роста дозы всех углеводов, кроме пентана (данные не приведены).

Содержание фитольных мембраносвязанных хлорофиллов a и b снижалось через сутки после обработки всеми углеводородами по сравнению с контролем и это снижение, в основном, было дозозависимым (исключение составила однократная ПДК бенз(а)пирена) (рис. 3). Особого внимания заслуживает возрастание содержания хлорофиллов спустя 3 сут после обработки как в контрольных, так и в опытных растениях по сравнению с количеством, обнаруженным через 1 сут (рис. 3). Одной из причин этого могло быть изменение сырой массы ткани листа (ее некоторое снижение) и, как следствие, расчетное повышение содержания пигментов. Нельзя исключить и возможности новообразования хлорофиллов в растениях, адаптировавшихся за 3 сут к лучшим по сравнению с природными условиям температуры и освещения, особенно, если связать это явление с физиологическими особенностями стадии осеннего кушения, характерного для многолетних травянистых злаков. Однако при этом возникает непростой вопрос о причинах заметной стимуляции хлорофиллообразования углеводородами. В работах А.А. Шлыка нечто подобное наблюдали при нарушении целостности мембран трипсином (Шлык, Малашев, 1970).

Изменения содержания бесфитольных хлорофиллов под влиянием углеводов (рис. 4) свидетельствуют о разной степени дефитолизации хлорофиллов через сутки после обработки. При этом дозовая зависимость процесса была невыразительной в случае пентана, гексана и бенз(а)пирена. Через 3 сут после обработки пентаном, гексаном и бензолом (1 и 100 ПДК) содержание бесфитольных форм было ниже величин, наблюдавшихся через 1 сут, а под влиянием о-ксилола, бенз(а)пирена и бутилацетата оно повышалось. В самом общем виде картина изменения содержания фитольных и бесфитольных пигментов после обработки всеми токсикантами носила противоположный характер.

Применение кластерного анализа позволило более наглядно выявить различия (или сходство) в действии углеводов разной химической природы на исследуемые процессы по виду денд-

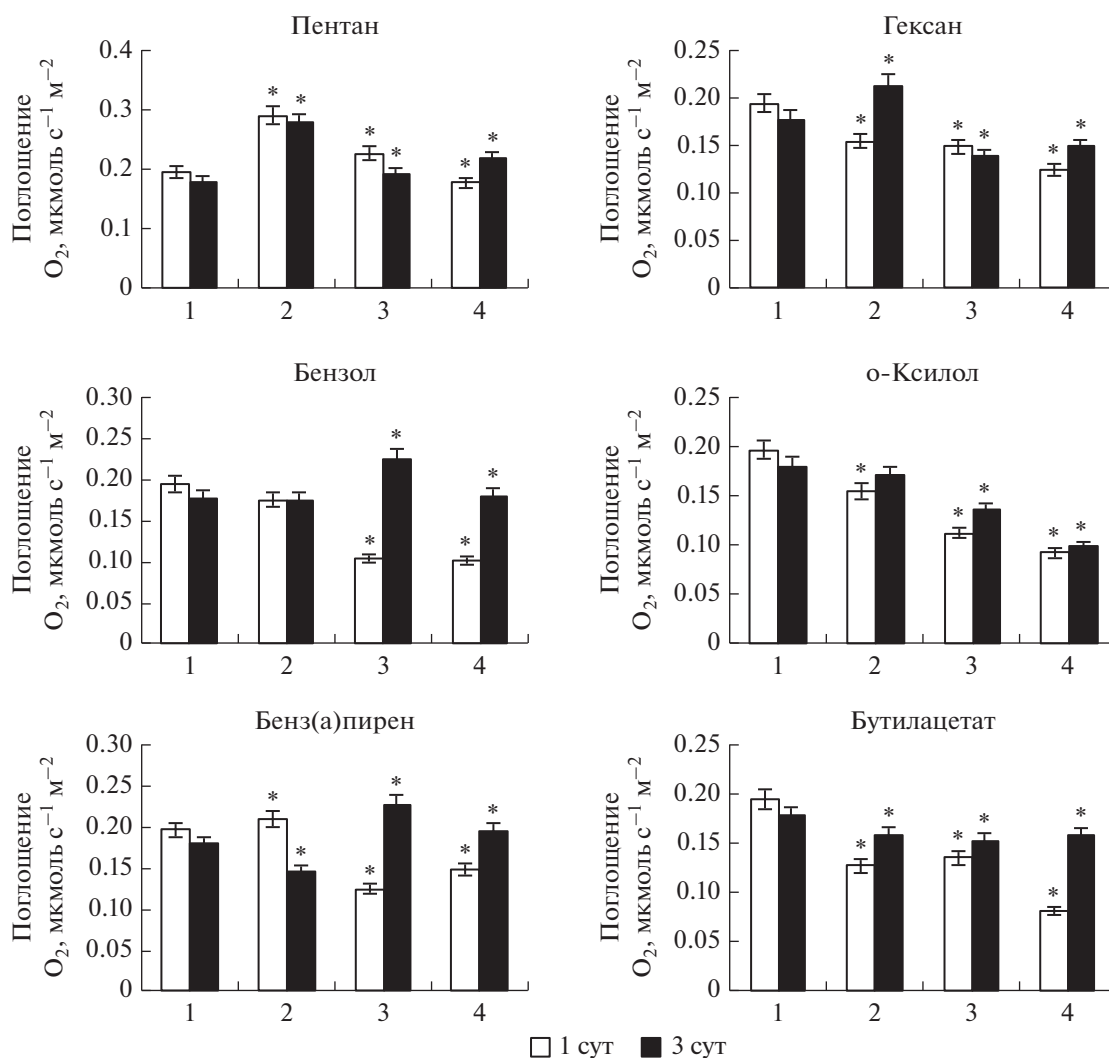


Рис. 1. Влияние углеводов на скорость поглощения кислорода в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 – контроль, 2 – 1 ПДК, 3 – 100 ПДК, 4 – 300 ПДК, * обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при $p < 0.05$.

рограмм. Так, через сутки после обработки влияние углеводов на дыхание (рис. 5) и фотосинтез (видимый и истинный, рис. 6) по характеру кластеризации было близким у пяти исследованных веществ и существенно отличалось от самого летучего пентана. При действии же углеводов на содержание фитольных пигментов от всех других отличался нелетучий бенз(а)пирен, а в случае бесфитольных – о-ксилол и бутилацетат, показывающие результаты, близкие к контролю (рис. 7). Вид дендрограмм через 3 сут после обработки растений отличался от наблюдаемого через 1 сут. Различия в ответе на обработку углеводами с увеличением времени их последствия до 3 сут могут характеризовать не только детоксирующие, но и адаптационные способности растений.

Характер кластеризации данных, в частности, количественная близость реакции растений на целую группу углеводов (пять из шести для дыхания, фотосинтеза и фитольных пигментов) позволил рассмотреть влияние веществ прежде всего как стрессоров одного типа без учета их возможного специфического действия. На рис. 8 показаны тенденции изменения исследованных параметров в зависимости от максимальной дозы углеводов (300 ПДК), которая, согласно данным табл. 1, отличалась содержанием действующих веществ на несколько порядков. Линии тренда, близость которых к фактическим данным оценивали по величине достоверности аппроксимации R^2 , указывали на их полиномиальный характер (хорошо описывались полиномом степени 2), означающий, что данным кривым в той или иной мере свойственны возрастание и убывание. Ре-

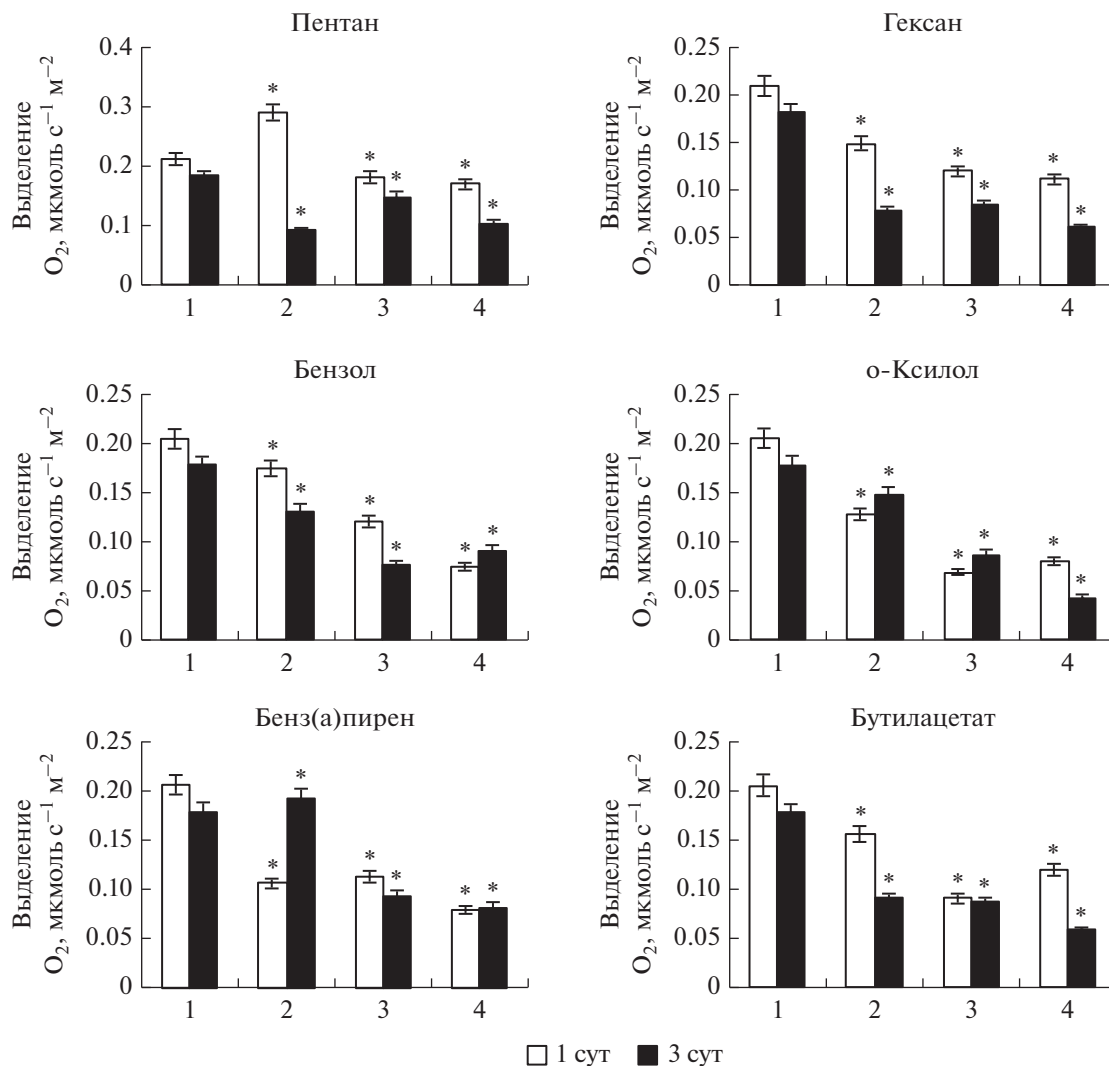


Рис. 2. Влияние углеводородов на видимый фотосинтез в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 — контроль, 2 — 1 ПДК, 3 — 100 ПДК, 4 — 300 ПДК, * обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при $p < 0.05$.

зультаты последействия токсикантов через 1 сут после обработки показали, что на нисходящем участке линии тренда для дыхания (бенз(а)пирен, бензол, о-ксилол и бутилацетат) (рис. 8а) величина отношения скорости процесса к контролю снижалась с ростом концентрации, а на восходящей ветви (пентан, гексан) — возрастала. Видны также различия в ходе линий тренда для дыхания и фотосинтеза (рис. 8а, 8в). В случае фитольных пигментов с довольно высокой достоверностью наблюдалось возрастание ингибирующего действия углеводородов по мере повышения их концентрации (рис. 8д). Зависимость изменений содержания бесфитольных пигментов от концентрации действующих веществ не просматривалась (рис. 8ж). Таким образом, связывать характер влияния углеводородов только с неспецифическим действием их разных концентраций как основной причиной об-

наруженных различий, в целом весьма затруднительно, особенно для дыхания, фотосинтеза и бесфитольных пигментов.

Тенденции изменения зависимости процессов от концентрации углеводородов через 3 сут после обработки (рис. 8б, 8г, 8е, 8з) заметно отличались от наблюдавшихся через 1 сут, но достоверность аппроксимации данных существенно снижалась для дыхания и фотосинтеза. Тенденция к корреляции между ростом ингибирования содержания фитольных и бесфитольных пигментов по мере увеличения содержания углеводородов, напротив, проявилась с высокой достоверностью (рис. 8е, 8з).

Количественные различия в кратковременном действии на растения ряда полициклических ароматических углеводородов в некоторых случаях связывают с их различной водорастворимостью (Ланкин, 2016). В наших экспериментах это пред-

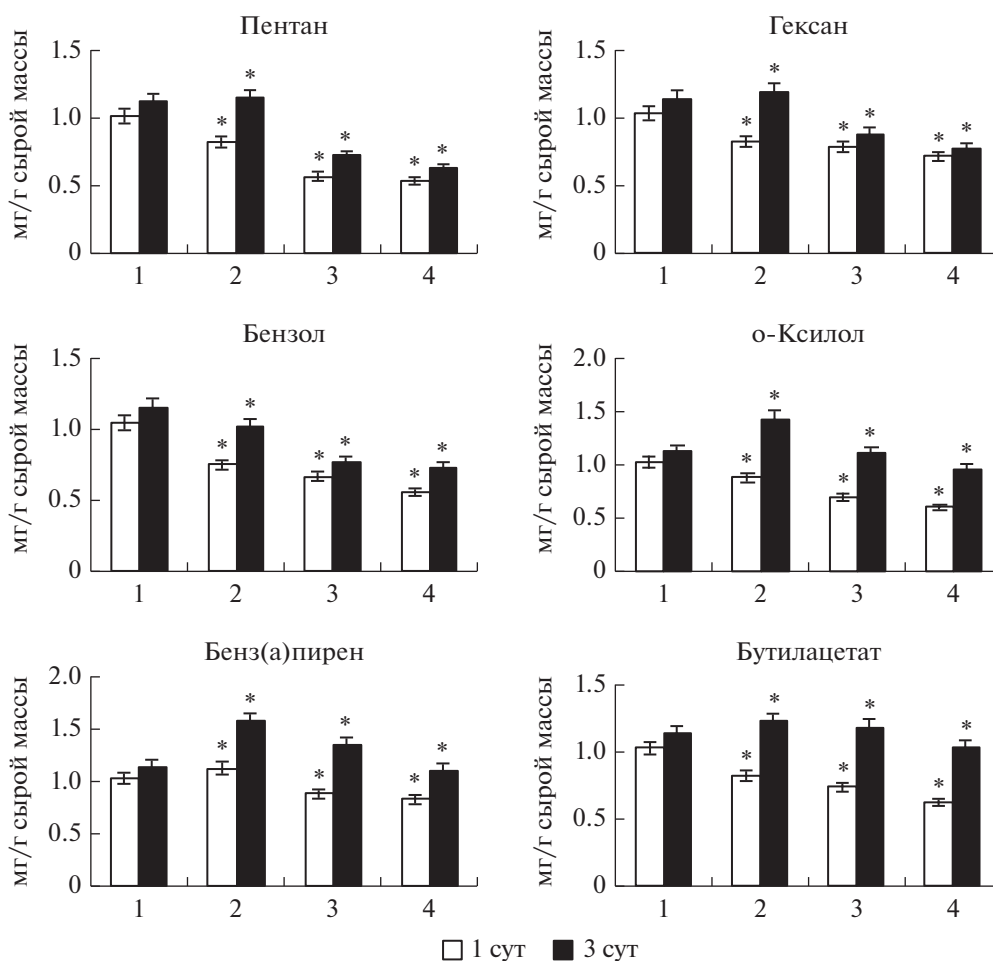


Рис. 3. Влияние углеводородов на содержание фитольных форм хлорофилловых пигментов (хлорофиллы *a + b*) в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 — контроль, 2 — 1 ПДК, 3 — 100 ПДК, 4 — 300 ПДК. * обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при $p < 0.05$.

положение сложно проверить из-за различий во времени последствия и содержании использованных веществ при одних и тех же уровнях ПДК. Более близкий к цитируемому выше для ПАУ пример влияния растворимости в наших опытах — сравнение данных для бензола и бутилацетата. Растворимость бензола в воде в 10 раз ниже растворимости бутилацетата, а максимальная концентрация обоих веществ при 300 ПДК одинакова. При этом заметна близость данных по степени приближения к контролю для скорости дыхания (рис. 8а) и содержанию фитольных пигментов (рис. 8д), но видимый фотосинтез ингибировался больше под действием бензола с более низкой растворимостью (рис. 8в). Количество же бесфитольных пигментов возрастало более существенно при действии бутилацетата с более высокой растворимостью (рис. 8е). Эти данные свидетельствуют скорее о разном влиянии растворимости углеводородов на исследованные процессы.

Спектр использованных нами углеводородов включал соединения, отличающиеся липофильностью (табл. 1). Данные, приведенные на рис. 9, свидетельствуют о довольно сложной и разнонаправленной зависимости исследованных процессов от липофильности углеводородов. Так, через сутки после обработки при повышении липофильности ингибирование дыхания снижалось (рис. 9а). Степень достоверности данных для скорости видимого фотосинтеза (рис. 9б) была невысокой, т.е., можно говорить о независимости изменений этого процесса от липофильности соединений. Содержание фитольных пигментов (рис. 9в) при росте липофильности углеводородов приближалось к контролю ($R^2 = 0.79$), что указывает на обратную зависимость между разрушением хлорофиллов и липофильностью. Тенденция изменения содержания хлорофиллидов, наблюдавшаяся на нисходящей ветви линии тренда (рис. 9г), может свидетельствовать о снижении дефитолизации хлорофиллов по мере ро-

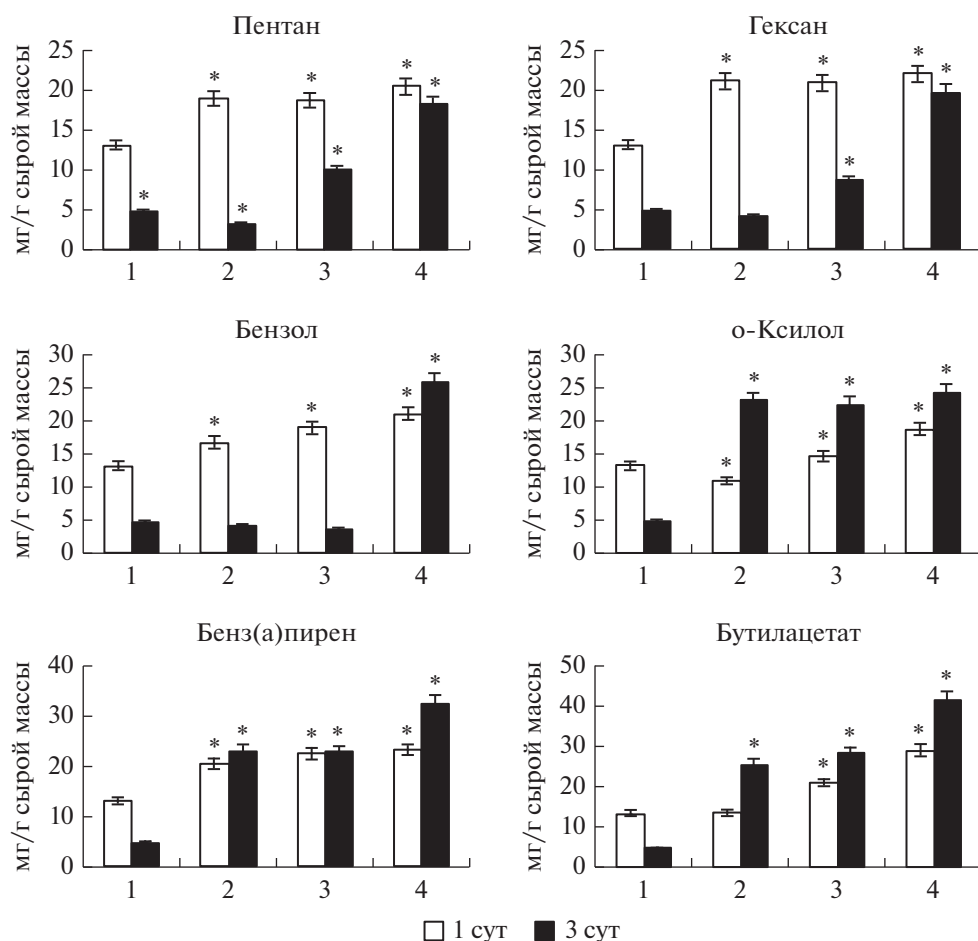


Рис. 4. Влияние углеводородов на содержание бесфитильных форм хлорофилловых пигментов (хлорофиллид $a + b$) в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. 1 – контроль, 2 – 1 ПДК, 3 – 100 ПДК, 4 – 300 ПДК. * обозначены достоверные различия по сравнению с контролем при $p < 0.05$.

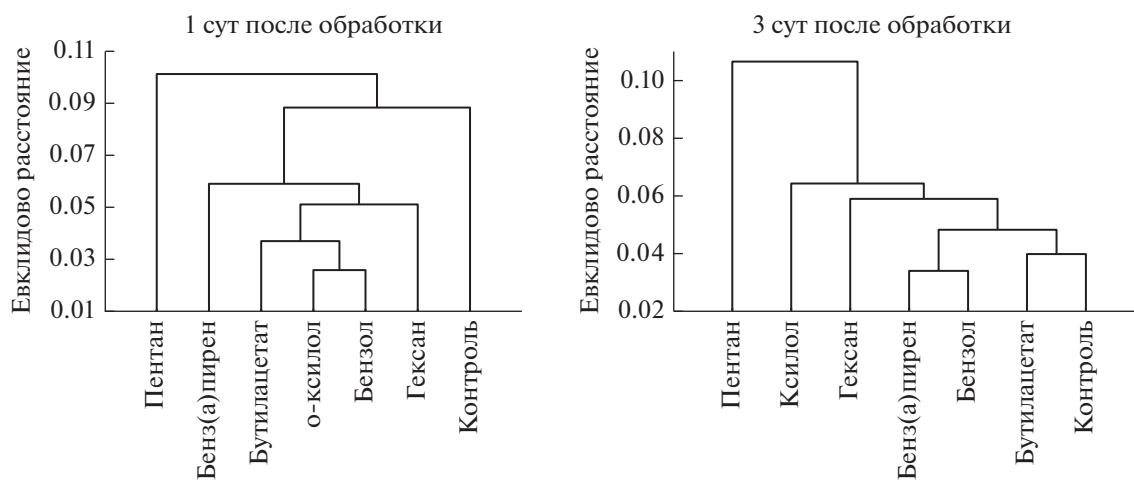


Рис. 5. Дендрограмма влияния углеводородов на скорость поглощения кислорода в листьях *F. arundinacea*.

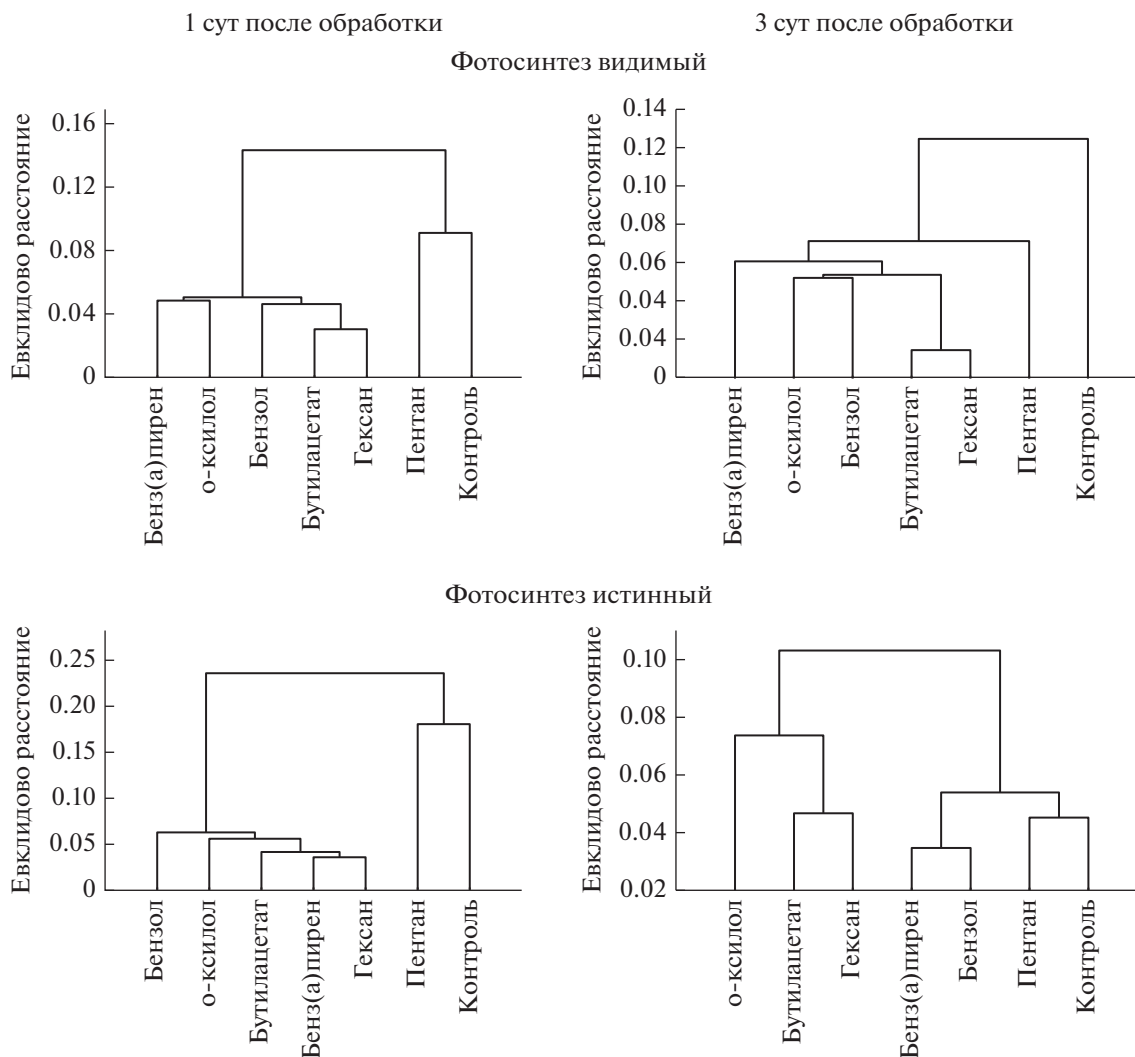


Рис. 6. Дендрограмма влияния углеводов на скорость выделения кислорода в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

ста липофильности углеводов ($R^2 = 0.51$). Для выяснения причин обнаруженных различий между липофильностью и направленностью разных исследованных нами процессов нужны корректные дополнительные исследования.

В настоящее время известно, что при стрессах могут изменяться физические свойства клеточных мембран живых организмов и эти изменения, в итоге, приводят к регуляции экспрессии генов стрессового ответа (Horváth *et al.*, 1998; Vigh *et al.*, 1998). Физическое состояние клеточных мембран можно регулировать экспериментально, изменяя температуру роста или обрабатывая клетки химическими веществами. Так, было показано, что под влиянием фенола, толуола и др. веществ активировался экстренный механизм изменения жирнокислотного состава и понижалась жидкость бактериальных мембран (Isken *et al.*, 1997). В работе (Kabelitz *et al.*, 2003) было установлено влия-

ние алифатических спиртов на насыщенность жирных кислот и возрастание их токсичности пропорционально гидрофобности. Первичные спирты способствовали изменению физических свойств мембран цианобактерий за счет увеличения их текучести (Huffer *et al.*, 2011; Mironov *et al.*, 2018). Следует отметить, что величины липофильности спиртов в этой работе и углеводов в наших экспериментах были близки. Однако концентрации спиртов в цитируемой работе (от 2 до 20 мМ) значительно превышали использованные нами (от 0.4 мМ до мкМ и нМ). С помощью высоких концентраций спиртов авторы (Mironov *et al.*, 2018) выявляли быстрые транскрипционные ответы уже через 30 мин. В наших экспериментах ответ на действие токсических веществ наблюдали спустя 24 и 72 ч. За это время развивалось множество событий детоксицирующего и адаптационного характера. Токсиканты могли взаимодействовать с

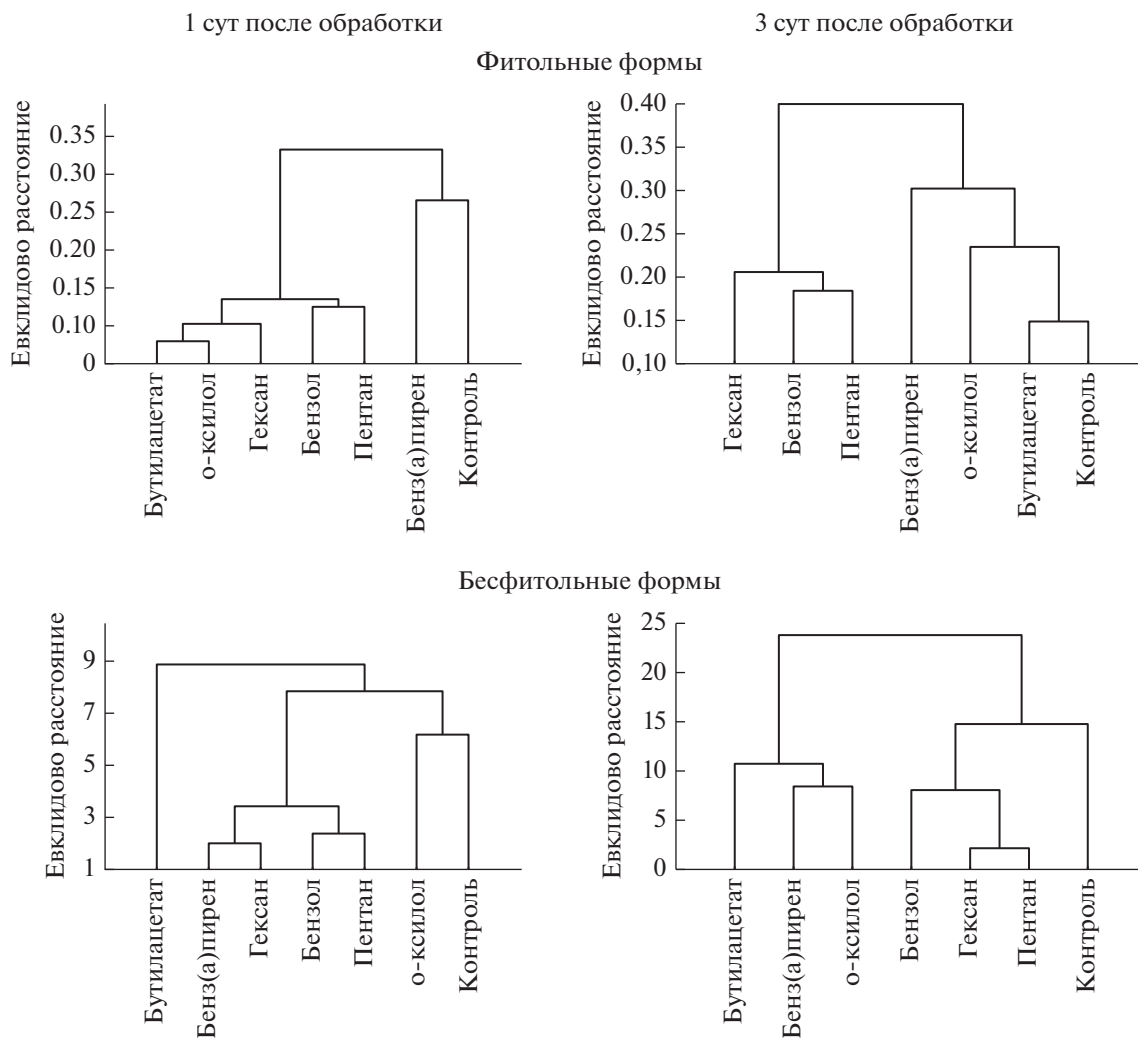


Рис. 7. Дендрограмма влияния углеводов на содержание фитольных и бесфитольных форм хлорофилловых пигментов в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

осуществляющей метаболизм ксенобиотиков и токсических веществ универсальной системой окисления липофильных соединений, существующей в разных компартментах каждой клетки (в наружной мембране митохондрий, ядерной мембране, лизосомах, митохондриях, пероксисомах). Вполне вероятно, что в итоге в наших экспериментах концентрации действующих токсичных веществ в клетках могли быть существенно ниже экзогенных, приближаясь к уровням, характерным для регуляторных веществ. Это дает возможность рассматривать исследованные в работе углеводороды прежде всего как регуляторы стрессовых ответов.

Для более полного понимания механизмов действия углеводов среди прочего важно знать и направленность корреляционных взаимодействий между процессами для разных веществ, представленных в табл. 2 и 3. Так, высокий отри-

цательный коэффициент корреляции (r) между содержанием фитольных и бесфитольных форм хлорофилловых пигментов (табл. 3) дает возможность в общих чертах говорить о том, что вне зависимости от причины, вызывающей изменение содержания мембраносвязанных пигментов, содержащих фитол (химическая природа токсических веществ, разные их дозы либо время последствий и, возможно, даже синтез новых молекул пигментов), снижению количества фитольной формы в ткани листа сопутствовало возрастание содержания бесфитольных пигментов и наоборот. Эта закономерность не проявлялась через 3 сут после обработки листьев ароматическими о-ксилолом и бенз(а)пиреном, что может указывать на детоксикацию этих веществ. С другой стороны, характерная для большинства углеводов отрицательная корреляционная взаимосвязь между темновым дыханием и фотосинтезом (табл. 3) нарушалась уже через сутки после обработки бенз(а)пиреном и

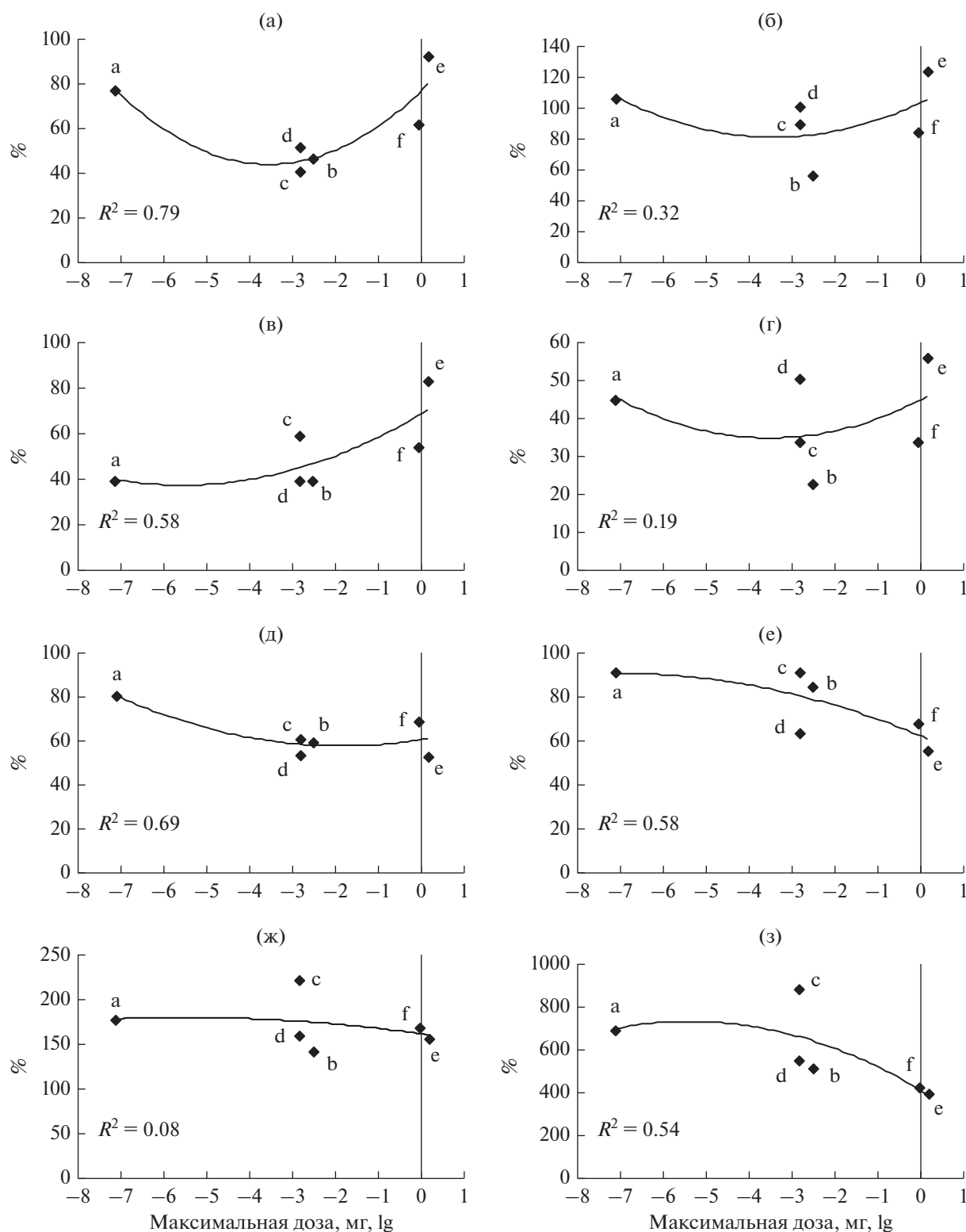


Рис. 8. Тенденции изменения скорости поглощения (а, б) и выделения кислорода (в, г – видимый фотосинтез), содержания фитильных (д, е) и бесфитильных (ж, з) хлорофилловых пигментов через 1 (а, в, д, ж) и 3 сут (б, г, е, з) после обработки углеводородами в зависимости от их максимальной дозы (300 ПДК в 50 мл): а – бенз(а)пирен, б – о-ксилол, в – бутилацетат, д – бензол, е – пентан, ф – гексан. Приведены линии тренда для полинома степени 2 и величины достоверности аппроксимации R^2 . На ординатах – данные в % к контролю.

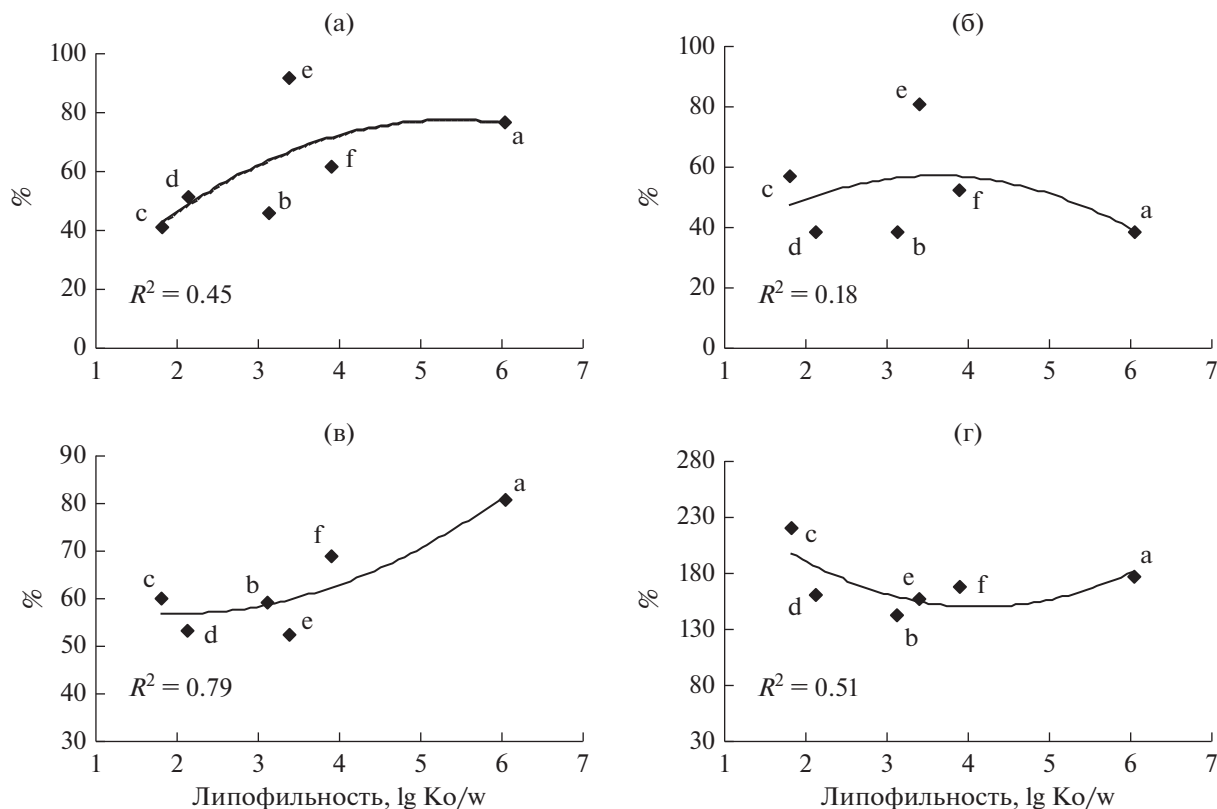


Рис. 9. Тенденции изменения скорости поглощения (а) и выделения кислорода (б – видимый фотосинтез), содержания фитольных (в) и бесфитольных (г) хлорофилловых пигментов через 1 сут после обработки углеводородами в зависимости от их липофильности: а – бенз(а)пирен, б – о-ксилол, с – бутилацетат, d – бензол, е – пентан, f – гексан. Приведены линии тренда для полинома степени 2 и величины достоверности аппроксимации R^2 . На ординатах – данные в % к контролю.

бутилацетатом, а через 3 сут обнаруживалась только у о-ксилола. При этом содержание бесфитольных пигментов, возникающих при разрушении фитольных, положительно коррелировало с дыханием и отрицательно с фотосинтезом (табл. 3). Высокая положительная корреляция между количеством хлорофиллидов и дыханием обнаружена через 1 сут после обработки всеми веществами,

а после 3 сут из этой тенденции выпадали бенз(а)пирен и бутилацетат. Разная по величине отрицательная корреляция между содержанием бесфитольных пигментов и фотосинтезом, наблюдавшаяся через сутки, нарушалась через 3 сут после обработки пентаном и бензолом.

Положительная корреляция между содержанием хлорофиллов, входящих в состав связанных

Таблица 2. Коэффициенты корреляции (r) между изменениями содержания бесфитольных и фитольных форм хлорофилловых пигментов, а также показателями интенсивности дыхания и фотосинтеза

Углеводород	Бесфитольные – Фитольные		Скорость темнового дыхания – скорость фотосинтеза	
	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут
Пентан	–0.87*	–0.93*	–0.94*	0.86*
Гексан	–0.97*	–0.90*	–0.78*	–0.14
Бензол	–0.99*	–0.58*	–0.89*	0.77*
о-Ксилол	–0.78*	0.05	–0.89*	–0.99*
Бенз(а)пирен	–0.54*	0.13	–0.07	0.88*
Бутилацетат	–0.87*	–0.93*	0.09	0.42

Примечание. * обозначены достоверные коэффициенты корреляции при $p < 0.05$.

Таблица 3. Коэффициенты корреляции (r) между содержанием разных форм хлорофилловых пигментов и показателями интенсивности дыхания и фотосинтеза (скорости процессов)

Углеводород	Бесфитольные – дыхание		Бесфитольные – фотосинтез		Фитольные – дыхание		Фитольные – фотосинтез	
	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут
Пентан	0.75*	0.62*	–0.47	0.15	–0.94*	–0.88*	0.99*	–0.53*
Гексан	0.94*	0.64*	–0.52*	–0.85*	–0.98*	–0.93*	0.88*	0.50*
Бензол	0.89*	0.42	–1.0*	–0.25	–0.82*	0.49*	0.99*	0.93*
о-Ксилол	0.98*	0.64*	–0.77*	–0.55*	–0.99*	–0.97*	0.87*	0.99*
Бенз(а)пирен	0.84*	–0.11	–0.61*	–0.57*	–0.90*	0.58*	0.51*	0.90*
Бутилацетат	0.80*	–0.34	–0.53*	–0.99*	–0.84*	0.30	0.46	0.99*

Примечание. * обозначены достоверные коэффициенты корреляции при $p < 0.05$.

с мембраной пигмент-белковых комплексов, и фотосинтезом (табл. 3) очевидна и понятна. Однако в случае обработки бенз(а)пиреном и бутилацетатом коэффициент корреляции между содержанием хлорофиллов и фотосинтезом был более низким даже через сутки после обработки, а через 3 сут у этих углеводородов исчезала и отрицательная корреляционная связь между дыханием и фотосинтезом (табл. 3). Таким образом, установившиеся через сутки корреляционные связи между исследованными процессами нарушались через 3 сут после обработки растений углеводородами.

Мы показали ранее, что появление бесфитольных пигментов, вызывающих образование синглетного кислорода, усиливало нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*, уровень которого зависел от химической природы углеводорода и времени его действия (Тюлькова и др., 2021). В настоящей работе установлено, что, несмотря на защиту от окислительного стресса посредством усиления нефотохимического тушения, после обработки углеводородами скорость фотосинтеза замедлялась и этот процесс количественно зависел от природы токсичных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя полученные данные, следует отметить, прежде всего, неодинаковую зависимость изменений дыхания (рис. 1), фотосинтеза (рис. 2) и содержания пигментов (рис. 3, 4) от химической природы углеводородов. Например, дыхание и фотосинтез стимулировались минимальными дозами самого летучего из углеводородов пентана, а зависимость ингибирующего эффекта в случае фотосинтеза и хлорофиллов, связанных с мембранами, от доз использованных веществ несколько отличалась при обработке разными веществами. Вычленив сходство и различия в действии токсикантов позволил кластерный анализ данных (рис. 5–7), благодаря которому была установлена количественная близость реакции растений на целую

группу углеводородов (пять из шести): в случае дыхания и фотосинтеза в нее не вошел пентан данные для которого были близки к контролю, а при анализе содержания хлорофиллов – бенз(а)пирен. Эти данные позволили рассмотреть влияние углеводородов прежде всего как стрессоров одного типа.

Тенденции изменения параметров исследованных процессов в зависимости от максимальной дозы (рис. 8) позволили установить отсутствие прямой количественной зависимости интенсивности наблюдаемых процессов от максимальных концентраций углеводородов, которые изменялись у разных веществ в очень широких пределах (от 0.4 мМ у пентана до 6 нМ у бенз(а)пирена для 300 ПДК). Такие количества веществ, даже если бы они беспрепятственно передвигались по клетке и сохранились неизменными вплоть до внутриклеточных органелл, вряд ли могли бы растворить достаточно большие фрагменты фотосинтетических мембран, чтобы заметно заингибировать фотосинтез и солубилизовать довольно большое количество мембраносвязанных пигментов. Эти результаты позволили рассматривать действие исследованных токсичных веществ прежде всего на регуляторном уровне, для которого значение концентраций не первостепенно, что не исключает наличия их пороговых количеств.

Поскольку все использованные в работе углеводороды липофильны, но прямой количественной связи уровня липофильности со степенью ингибирования исследованных процессов не установлено (рис. 9), то вполне вероятно, что величина ингибирующего эффекта, характеризующая их токсичность, может зависеть от специфических особенностей взаимодействия углеводородов с разными типами мембран (цитоплазматическими, митохондриальными и хлоропластными).

Исследование корреляционных взаимосвязей между уровнем деструкции хлорофилловых пигментов, вызванной влиянием на растения орга-

нических соединений техногенной природы, и изменением скоростей темнового дыхания и фотосинтеза позволило получить результаты, имеющие самостоятельное значение. Кроме этого, данные о том, что установившиеся через сутки корреляционные связи между исследованными процессами нарушались через 3 сут после обработки растений углеводородами (табл. 2 и 3), наряду с информацией, полученной с помощью кластерного анализа (рис. 5–7), позволяют судить о том, что различия в ответе на обработку углеводородами с увеличением времени их последующего действия до 3 сут могут характеризовать не только детоксицирующие, но и адаптационные способности растений.

Исследование влияния на растения овсяницы продуктов выброса предприятий (предельных и ароматических углеводородов) при распылении их воздушно-капельным путем показало, что даже дозы, превышающие в 300 раз предельно допустимые по существующим нормативам, ориентированным на сохранение здоровья человека, не оказывали заметного повреждающего действия и через 3 сут после обработки визуально растения не отличались от контрольных, демонстрируя высокую устойчивость.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверина Н.Г., Емельянова А.В., Шербаков Р.А., Козел Н.В., Обуховская Л.В., Усатов А.В. Фотосинтез и скорость поглощения кислорода в растениях озимого рапса, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 6. С. 461–472.
- Акиншина Н.Г., Азизов А.А., Карасева Т.А., Клозе Э. Новые возможности в оценке состояния растений // Сибирский экологический журн. 2008. Т. 2. С. 249.
- Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. Т. 1. М.: Мир, 1986. 393 с.
- Иконен Е.Н., Шибаева Т.Г., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф. Реакция дыхания проростков озимой пшеницы на продолжительное и кратковременное ежесуточное понижение температуры // Физиология растений. 2020. С. 312–318.
- Кабашикова Л.Ф. Фотосинтетический аппарат и потенциал продуктивности хлебных злаков. Минск: Беларус. навука, 2011. 327 с.
- Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода флуоресценции хлорофилла. К.: Альтерпресс, 2002. 188 с.
- Ланкин А.В. Механизмы токсического действия полициклических ароматических углеводородов на фотосинтетический аппарат: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2016. 22 с.
- Постановление М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 08.11.2016 г., № 113 // [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://pravo.by_1485896400.pdf. — Дата доступа: 22.03.2022.
- Руководство по эксплуатации PlantVital 5030. Штраусберг: INNO-Concept GmbH, 2008. 18 с.
- Тюлькова Е.Г., Кабашикова Л.Ф. Влияние летучих органических соединений на перекисное окисление липидов овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. // Весці НАН Беларусі. Серыя біял. навук. 2019. № 4. С. 411–412.
- Тюлькова Е.Г., Савченко Г.Е., Кабашикова Л.Ф. Использование амплитудно-импульсной модулированной флуориметрии для оценки действия летучих органических соединений и бенз(а)пирена на функциональную активность фотосистемы II в листьях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* Schreb. // Журн. прикладной спектроскопии. 2021. № 5. С. 767–777.
- Тюлькова Е.Г., Савченко Г.Е., Кабашикова Л.Ф. Дегградация хлорофилла в листьях овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* при действии летучих органических соединений и бенз(а)пирена // Известия РАН. Серия биологическая. 2022. № 4. С. 363–373.
- Шлык А.А., Малашевич А.В. Ускорение образования хлорофилла b и лабилизация хлорофилла a при гидролизе белков хлоропластов трипсином // Доклады АН СССР. 1970. Т. 194. № 3. С. 715–718.
- Carvalho R., Szlafsztein C.F. Urban vegetation loss and ecosystem services: The influence on climate regulation and noise and air pollution // Environ. Pollut. 2019. V. 245. P. 844–852.
- Hansch C., Leo A., Hoekman D. Exploring QSAR – Hydrophobic, Electronic and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. 348 p.
- Harpaz-Saad S., Azoulay T., Arazzi T., Ben-Yaakov E., Mett A., Shibolet Y.M., Hörtensteiner S., Gidoni D., Amit Gal-On, Goldschmidt E.E., Eyal Y. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is post-translationally regulated // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 1007–1022.
- Haynes W.M., Lide D.R., Bruno T.J. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 95th Edition / CRC Press LLC, Boca Raton: FL, 2014–2015. 2666 p.
- Horvath I., Glatz A., Varvasovszki, Vigh L. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: Identification of hsp17 as a “fluidity gene” // Proc Natl Acad Sci USA. 1998. V. 95 (7). P. 3513–3518.
- Huffer S., Clark M.E., Ning J.C., Blanch H.W., Clark D.S. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 6400–6408.
- Isken S., Santos P., JAM de Bont. Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48 (5). P. 642–647.
- Jacotot A., Marchand C., Gensous S., Allenbach M. Effects of elevated atmospheric CO₂ and increased tidal flooding on leaf gas-exchange parameters of two common mangrove species: *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa* // Photosynthesis Research. 2018. V. 138. P. 249–260.
- Kabelitz N., Santos P.M., Heipieper H.J. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of mem-

- brane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus* // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 220. P. 223–227.
- Kanchan J., Bhatia V.S., Govind, Pandey G.P. Impact of elevated temperatures on specific leaf weight, stomatal density, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in soybean // Photosynthesis Research. 2017. V. 131. P. 333–350.
- Kreslavski V.D., Lankin A.V., Vasilyeva G.K., Luybimov V.Yu., Semenova G.N., Schmitt F.-J., Friedrich T., Allakhverdiev S.I. Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 81. P. 135–142.
- Lichenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. 2001. V. 1 (1). P. F4.3.1–F4.3.8.
- Miao Qi, Xiaodi Liu, Yibo Li, He Song, Zuotian Yin, Feng Zhang, Qijin He, Zhenzhu Xu, Guangsheng Zhou. Photosynthetic resistance and resilience under drought, flooding and rewetting in maize plants // Photosynthesis Research. 2021. V. 148. P. 1–15.
- Mironov K., Shumskaya M., Sidorov R.A., Trofimova M.S., Los D.A. Membrane physical state and stress regulation in *Synechocystis*: fluidizing alcohols repress fatty acid desaturation // The Plant Journal. 2018. V. 96. P. 1007–1017.
- Mosaddegh M.H., Jafarian A., Ghasemi A., Mosaddegh A. Phytoremediation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene contaminated air by *D. deremensis* and *O. microdasy* plants // J. Environ. Health Sci. and Eng. 2014. № 12. P. 39–52.
- Ramazan S., Bhat H.A., Zargar M.A., Ahmad P., Riffat J. Combined gas exchange characteristics, chlorophyll fluorescence and response curves as selection traits for temperature tolerance in maize genotypes // Photosynthesis Research. 2021. V. 150. P. 213–225.
- Singh S.K., Reddy V.R. Response of carbon assimilation and chlorophyll fluorescence to soybean leaf phosphorus across CO₂: Alternative electron sink, nutrient efficiency and critical concentration // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 2015. V. 151. P. 276–284.
- Vigh L., Maresca B., Harwood J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? // Trends in biochemical sciences. 1998. V. 23. P. 369–374.
- Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function // J. of the American Statistical Association, 1963. 236 p.
- Zaouali W., Mahmoudi H., Salah I., Mejri F., Casabianca H., Hosni K., Ouerghi Z. Copper-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidative system activities and lipid metabolism of cilantro (*Coriandrum sativum* L.) // Biologia. 2020. V. 75. P. 367–380.

Connectivity of Photosynthesis and Respiration with Content of Chlorophyll Pigments in Plants of Reed Fescue *Festuca arundinacea* Schreb. Under the Impact of Alkanes and Aromatic Hydrocarbons

E. G. Tyulkova^{1, #}, G. E. Savchenko², and L. F. Kabashnikova²

¹ Gomel State Medical University, st. Lange, 5, Gomel, 246000 Belarus

² Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, st. Akademicheskaya, 27, Minsk, 220072 Belarus

[#]e-mail: tut-3@mail.ru

The association of degradation of membrane-bound chlorophyll with changes in dark respiration rates and photosynthesis in *Festuca arundinacea* Schreb. leaves under the influence of various concentrations of limit and aromatic hydrocarbons present in technogenic emissions was studied. 1 day after intoxication a negative correlation between the content of non-phytol forms of pigments and the rate of photosynthesis was found. Positive correlation was found between the content of: 1) phytol forms and the rate of photosynthesis; 2) non-phytol forms and respiration rate. The relationships between the processes changed after 3 days characterizing the detoxifying and adaptability of plants.

Keywords: reed fescue, hydrocarbons, photosynthesis, respiration, phytol and non-phytol forms of chlorophylls