

УДК 574.24

ДЕГРАДАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ ОВСЯНИЦЫ ТРОСТНИКОВОЙ (*Festuca arundinacea*) ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И БЕНЗ(А)ПИРЕНА

© 2022 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 НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск, 220072 Беларусь

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

Поступила в редакцию 31.01.2021 г.

После доработки 26.03.2021 г.

Принята к публикации 07.04.2021 г.

Исследовали пути деградации хлорофилла *a* и *b* в листьях овсяницы тростниковой (*Festuca arundinacea*) при действии летучих органических соединений (пентана, гексана, бензола, *o*-ксилола, бутилацетата) и бенз(а)пирена. В качестве маркеров разрушения хлорофилла *a* и *b* использовали активность хлорофиллазы, удаляющей фитол, и степень феофитинизации хлорофилла *a*. Обнаружено дозозависимое снижение содержания мембраносвязанных хлорофилловых пигментов в результате действия всех использованных углеводов, наиболее ярко проявившееся при действии *o*-ксилола через одни сутки после обработки. Разрушение пигментов, содержащих фитол, происходило как путем феофитинизации, так и посредством дефитолизации. Корреляция между активностью хлорофиллазы и степенью феофитинизации отсутствовала.

Ключевые слова: хлорофилл, овсяница тростниковая, летучие органические соединения, бенз(а)пирен, хлорофиллаза, феофитин

DOI: 10.31857/S1026347022040151

В настоящее время накоплено значительное количество достаточно противоречивых результатов о структурно-функциональном состоянии фотосинтетического аппарата различных видов растений, произрастающих в стрессовых условиях, включающих техногенное воздействие. С одной стороны, установлено, что при антропогенной нагрузке фотосинтетическая система ряда городских растений способна компенсировать стрессовое состояние растений и увеличивать содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов), что авторы рассматривают как защитную реакцию (Савинцева, 2015). С другой стороны, имеются данные о резком снижении количества пигментов в клетках растений при действии неорганических газообразных токсикантов, таких как оксиды серы, азота, угарный газ, аммиак, сероводород (Malallaha *et al.*, 1996; Garty *et al.*, 2007; Sarah *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010, 2012; Arellanoab *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2017; Jiaoas *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017; Ноаи *et al.*, 2018; Popek *et al.*, 2018; Ryzdyński *et al.*, 2019; Sha Sha *et al.*, 2019), и загрязнении почв тяжелыми металлами, влияющими на дефицит железа в растениях (Шальго, 2004).

Значительный удельный вес в выбросах современных промышленных предприятий занимают

летучие органические загрязнители. Исследование их влияния на окружающую среду направлено, в основном, на развитие фитотехнологий, в которых растения выступают в роли своеобразной фильтрационной системы, способствующей снижению степени токсического действия загрязнителей, вплоть до поиска комнатных декоративных растений, наиболее эффективно и быстро поглощающих бензол, толуол, этилбензол, ксилол из воздуха закрытых помещений (Mosaddegh *et al.*, 2014). Для объективного суждения об эффективности их действия необходимы маркеры, на роль которых напрашиваются, в первую очередь, показатели фотосинтетического аппарата. Влияние органических соединений, в том числе летучих, на структуру и эффективность функционирования фотосинтетического аппарата растений изучено недостаточно. На примере травянистых растений показано, что нафталин, фенантрен и флуорантен повышали проницаемость биологических мембран, снижали содержание пигментов и скорость фотосинтеза в течение вегетационного периода (Пемобayo *et al.*, 2010; Kreslavski *et al.*, 2014); нафталин и фенантрен способствовали увеличению величины нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, развитию окислительного

стресса и повреждению липидного бислоя плазматических мембран (Kreslavski *et al.*, 2017).

Проблема влияния летучих органических соединений на деградацию фотосинтетических пигментов тесно связана с изучением путей катаболизма хлорофилла в растении в различных условиях: при старении, созревании фруктов, изменении условий освещения, действии неблагоприятных факторов. Долгое время ведущую роль в деградации хлорофилла отводили ферменту хлорофиллазе (хлорофилл-хлорофиллид-гидролаза, ЕС 3.1.1.14), отщепляющей фитол, что способствует уменьшению молекулярного взаимодействия между молекулами хлорофилла и снижает эффективность миграции энергии возбуждения между его молекулами (Takamiya, Nishimura, 1972). Освободившиеся от связи с мембраной молекулы хлорофиллида становятся фотодинамически опасными, что делает особенно интересной информацию о содержании последних при различных неблагоприятных воздействиях. Известно, что хлорофиллаза функционирует как гидрофобный димерный белок в диапазоне температур от 10 до 75°C (Arkus *et al.*, 2005). Взгляды на локализацию фермента претерпевают изменения, что еще более повышает интерес к этому ферменту. Важной для нас является информация о том, что инактивировать хлорофиллазу могут мембранные липиды – фосфатидилглицерин и сульфохинолизилидиацилглицерин (Lambers, Terpstra, 1985). Представляет интерес и тканеспецифичность активности хлорофиллазы в растениях с различной окраской листьев (Chen *et al.*, 2012, 2018), а также зависимость ее активности от интенсивности освещения у светолюбивых и теневыносливых растений (Фомішина и др., 2009). Интригующими являются данные об отсутствии корреляции между экспрессией хлорофиллазы и типичными моделями экспрессии генов, связанных со старением листьев (Büchert *et al.*, 2011).

Еще одним из путей деградации хлорофилла является замещение ионов магния на атомы водорода в молекуле пигмента, в результате чего образуется феофитин, обладающий антиоксидантными свойствами (Kusmita *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2018). Известно, что феофитинизация хлорофилла происходит при старении листьев, действии соляной кислоты, гербицидов, хелаторов металлов (Аверина и др., 1991). Некоторые авторы считают, что первой стадией разрушения хлорофилла в листьях является удаление магния, катализируемое феофитиназой (феофитин-феофорбид гидролазой, ЕС 3.1.1.14), в то время как хлорофиллаза ответственна за деградацию пигментов при созревании фруктов (Сиваш, Золотарева, 2013; Syvash, Zolotareva, 2017).

Анализ литературы показал, что исследованию путей деградации хлорофилла, приводящих к

удалению фитола и магния из молекулы хлорофилла, при действии органических загрязнителей уделяется недостаточно внимания, что в значительной степени мотивировало нашу работу. Мы попытались исследовать вклад дефитолизации посредством хлорофиллазы и феофитинизации в деградацию мембраносвязанных молекул хлорофилла *a* и *b* на примере овсяницы тростниковой (*Festuca arundinacea*) под действием различных концентраций летучих органических соединений (пентана, гексана, бензола, *o*-ксилола, бутилацетата) и бенз(а)пирена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Летучие органические соединения и способ воздействия. Использование пентана, гексана, бензола, *o*-ксилола, бутилацетата обусловлено преобладающим количеством группы летучих органических соединений, представителями которой являются данные вещества, в выбросах отдельных промышленных предприятий Гомеля (ОАО “Гомельский завод литья и нормалей”) по сравнению с другими загрязняющими веществами. Что касается бенз(а)пирена, то, несмотря на невысокое наличие в выбросах предприятий теплоэнергетики (ТЭЦ), его использование в эксперименте связано с высокой токсичностью, способностью в небольших количествах вызывать значительный эффект, недостаточной изученностью характера и закономерностей влияния на параметры жизнедеятельности растений и возможностью проведения сравнительной оценки влияния полициклического ароматического углеводорода и одноядерных ароматических углеводородов (бензола, *o*-ксилола) на растения.

В модельном эксперименте листовые пластинки овсяницы тростниковой обрабатывали водными растворами углеводородов, дозы которых рассчитывали исходя из установленных для атмосферного воздуха предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ. В соответствии с нормативами, ПДК пентана в атмосферном воздухе составляет 100000.0 мкг/м³; гексана – 60000.0 мкг/м³; бензола – 100.0 мкг/м³; ксилолов – 200.0 мкг/м³; бутилацетата – 100.0 мкг/м³; бенз(а)пирена – 5.0 нг/м³. Для всех соединений, кроме бенз(а)пирена, использовали величину максимальной разовой ПДК; для бенз(а)пирена – среднесуточную ПДК. В работе использовали следующие концентрации токсикантов: 0.0001–0.03 мг/мл – для пентана; 0.00006–0.018 мг/мл – для гексана; 0.0001–0.03 мкг/мл – для бензола; 0.0002–0.06 мкг/мл – для *o*-ксилола, 0.000005–0.0015 нг/мл – для бенз(а)пирена и 0.0001–0.03 мкг/мл – для бутилацетата (бутилового эфира уксусной кислоты). Растворимость пентана в воде составляет 0.036 г/100 г при 16°C; гексана – 0.014 г/100 г при 15°C; бензола – 0.082 г/100 г при 16°C;

ксилола — 0.015 г/100 г при 16°C; бутилацетата — 0.83 г/100 г при 25°C.

Обработку листовых пластинок осуществляли путем аэрозольного опрыскивания водными растворами (доза — 50 мл), исходя из их сходства с агрегатным состоянием летучих органических соединений в атмосферном воздухе. Контролем служили необработанные растения овсяницы тростниковой. Материал анализировали через одни и трое суток после обработки.

Исследование овсяницы тростниковой *F. arundinacea*. Объектом исследований служили растения овсяницы тростниковой (*F. arundinacea*) как одного из наиболее распространенных представителей травянистых растений в городских условиях. Растения выращивали в течение месяца в пластиковых контейнерах с грунтом при интенсивности освещения 120 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ с фотопериодом 14 ч при температуре 22°C. Для обработки растворами летучих органических соединений и бенз(а)пирена отбирали листья одинакового размера, визуально контролируя отсутствие повреждений и степень сформированности пигментного аппарата.

Исследование природных образцов. Для подтверждения предположения о влиянии используемых в эксперименте соединений на процессы дефитолизаии хлорофилла *a* и *b* посредством хлорофиллазы и феофитинизации хлорофилла *a* в листьях травянистых растений нами были отобраны образцы листьев овсяницы тростниковой из естественной среды. Эти растения произрастают вблизи завода литья и нормалей (ОАО «ГЗЛиН») и предприятия теплоэнергетики, которые содержат в своих выбросах использованные в эксперименте соединения. В качестве контрольных условий использовали часть территории национального парка Припятский, свободную от влияния промышленной деятельности и интенсивного транспорта.

Определение активности хлорофиллазы. Разделение фитольных и бесфитольных форм хлорофилловых пигментов проводили после экстракции пигментов 80%-ным ацетоном (Narraz-Saad *et al.*, 2007). Для этого сначала сырые листья (200 мг в пробе) растирали в 6 мл 80%-ного ацетона. За-

тем квоты (по 2 мл каждая) полученного водно-ацетонового экстракта добавляли в пробирки, содержащие 0.5 мл 10 мМ КОН и 3 мл гексана, и центрифугировали. Разделение пигментов проводили в 3-кратной повторности. Концентрацию хлорофилла *a* и хлорофиллида *a* ($c_{\text{хл-ла } a}$, $c_{\text{хл-ла } a}$, мг/мл), а также хлорофилла *b* и хлорофиллида *b* ($c_{\text{хл-ла } b}$, $c_{\text{хл-ла } b}$, мг/мл) определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu UV-2401 PC) по формулам 1 и 2:

$$c_{\text{хл-ла } a}(c_{\text{хл-ла } a}) = 12.7D_{663} - 2.69D_{645}, \quad (1)$$

$$c_{\text{хл-ла } b}(c_{\text{хл-ла } b}) = 22.9D_{645} - 4.68D_{663}, \quad (2)$$

где D_{645} и D_{663} — оптическая плотность при длинах волн 645 нм и 663 нм. Содержание фитольных и бесфитольных форм в итоге пересчитывали на сырую массу.

Для определения активности хлорофиллазы отбирали две навески, в первой из которых определяли содержание нативных фитольных и бесфитольных форм пигментов, как описано выше. Во второй навеске определяли содержание хлорофиллида после действия хлорофиллазы (Narraz-Saad *et al.*, 2007). Для этого листья растирали в 60%-ном ацетоне в присутствии $CaCO_3$ и инкубировали в течение одного часа в темноте. Реакцию останавливали добавлением 99.5%-ного ацетона до конечной концентрации 80%. Об активности хлорофиллазы судили по количеству хлорофиллида, образовавшегося в пробе после одного часа инкубации в темноте, в процентах к общему содержанию зеленых пигментов в первой навеске. Измерения проводили в 3-кратной повторности.

Определение содержания феофитина. Для определения содержания феофитина *a* 25 мг сырых листьев растирали в 5 мл 90%-ного ацетона (Radojevič, Bashkin, 2006) и регистрировали оптическую плотность на длинах волн 664 и 750 нм. Далее в экстракты добавляли 0.1 мл 0.1 М HCl, перемешивали и регистрировали оптическую плотность на длинах волн 665 и 750 нм. Содержание хлорофилла *a* и феофитина *a* определяли по формулам 3 и 4:

$$c_{\text{хл-ла } a} = (((D_{664} - D_{750}) - (D_{665} - D_{750}))V_1) / 26.7V_2, \quad (3)$$

$$c_{\text{феоф } a} = ((1.7 \times (D_{665} - D_{750}) - (D_{664} - D_{750}))V_1) / 26.7V_2, \quad (4)$$

где $c_{\text{хл-ла } a}$, $c_{\text{феоф } a}$ — концентрация хлорофилла *a* и феофитина *a* (мг/мл); D_{644} , D_{645} , D_{750} — оптическая плотность при длинах волн 664, 665 и 750 нм; 26.7 — поправка на поглощение, равная произведению коэффициента поглощения для хлорофилла *a* при 664 нм (11) и отношения, выражающего коррекцию на подкисление (2.43); V_1 и V_2 — объемы образца и экстракта образца, соответственно (мл).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 1 представлено изменение содержания фитольных (хлорофилл *a* + *b*) и бесфитольных (хлорофиллид *a* + *b*) форм хлорофилловых пигментов в результате действия на листья растений овсяницы тростниковой различных летучих органических соединений и бенз(а)пирена.

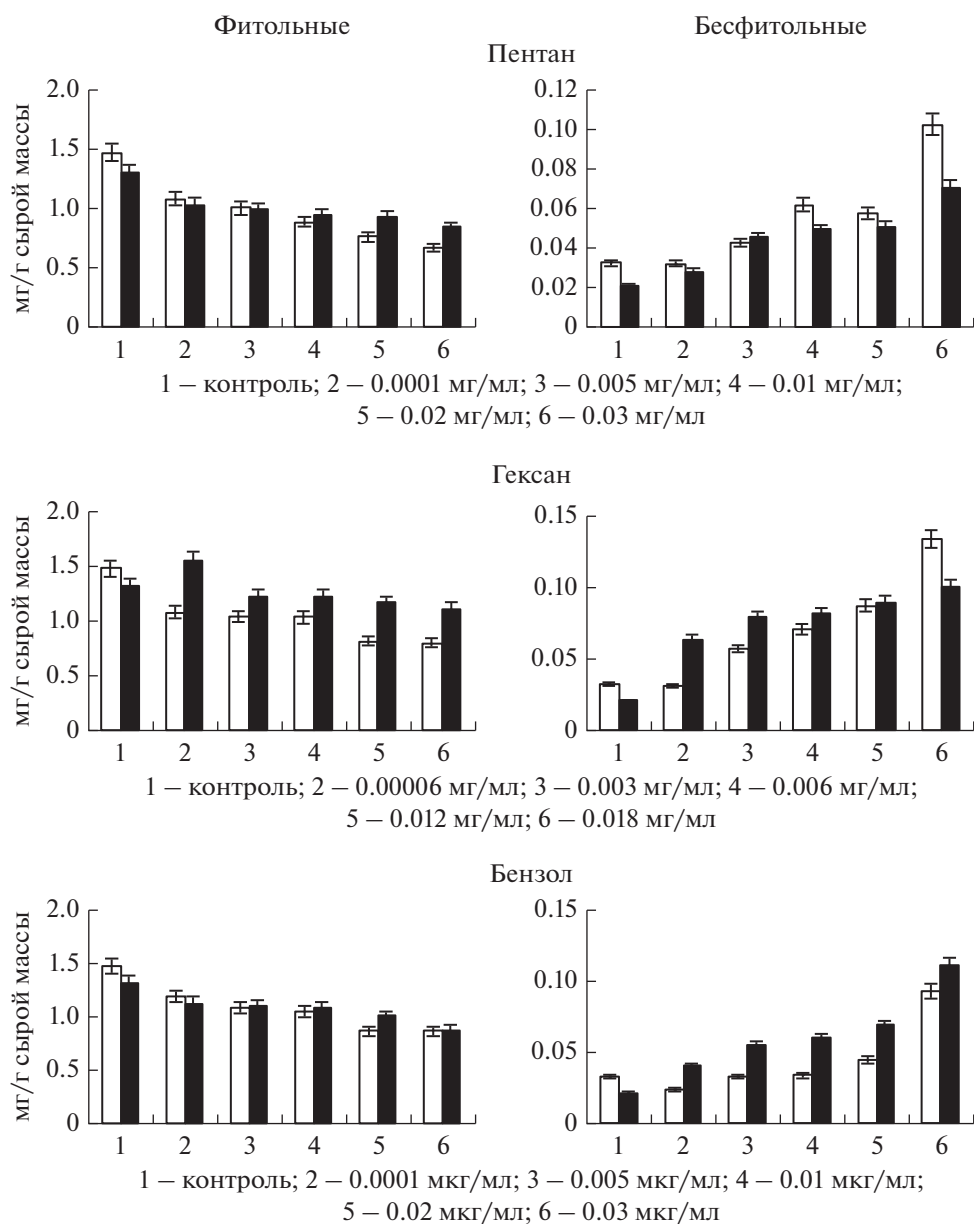


Рис. 1. Влияние летучих органических соединений и бенз(а)пирена на содержание фитольных (хлорофилл $a + b$) и бесфитольных (хлорофиллид $a + b$) форм хлорофилловых пигментов в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

Из данных рис. 1 видно, что во всех случаях степень убыли хлорофилловых пигментов, как правило, зависела от концентрации использованного токсического соединения, времени его действия и химической активности. Так, при воздействии практически всех концентраций пентана и гексана наблюдали снижение содержания фитольных форм пигментов и увеличение содержания бесфитольных форм по сравнению с контролем. При этом наиболее интенсивное снижение содержания фитольных форм пигментов и рост содержания бесфитольных происходили через одни сутки. Известно, что опасность воздействия

алканов на растения связана с их достаточно высокой стойкостью на фоне невысокой химической активности, поскольку для протекания реакций с участием алканов необходимы высокая температура или ультрафиолетовое излучение (Бандман и др., 1990).

Из двух использованных одноядерных ароматических соединений (бензол и *o*-ксилол) наибольшую токсичность в отношении фитольных форм пигментов наблюдали для *o*-ксилола через одни сутки после обработки. Его токсичное действие на фитольные формы снижалось через трое суток, но при этом повышалось содержание бесфи-

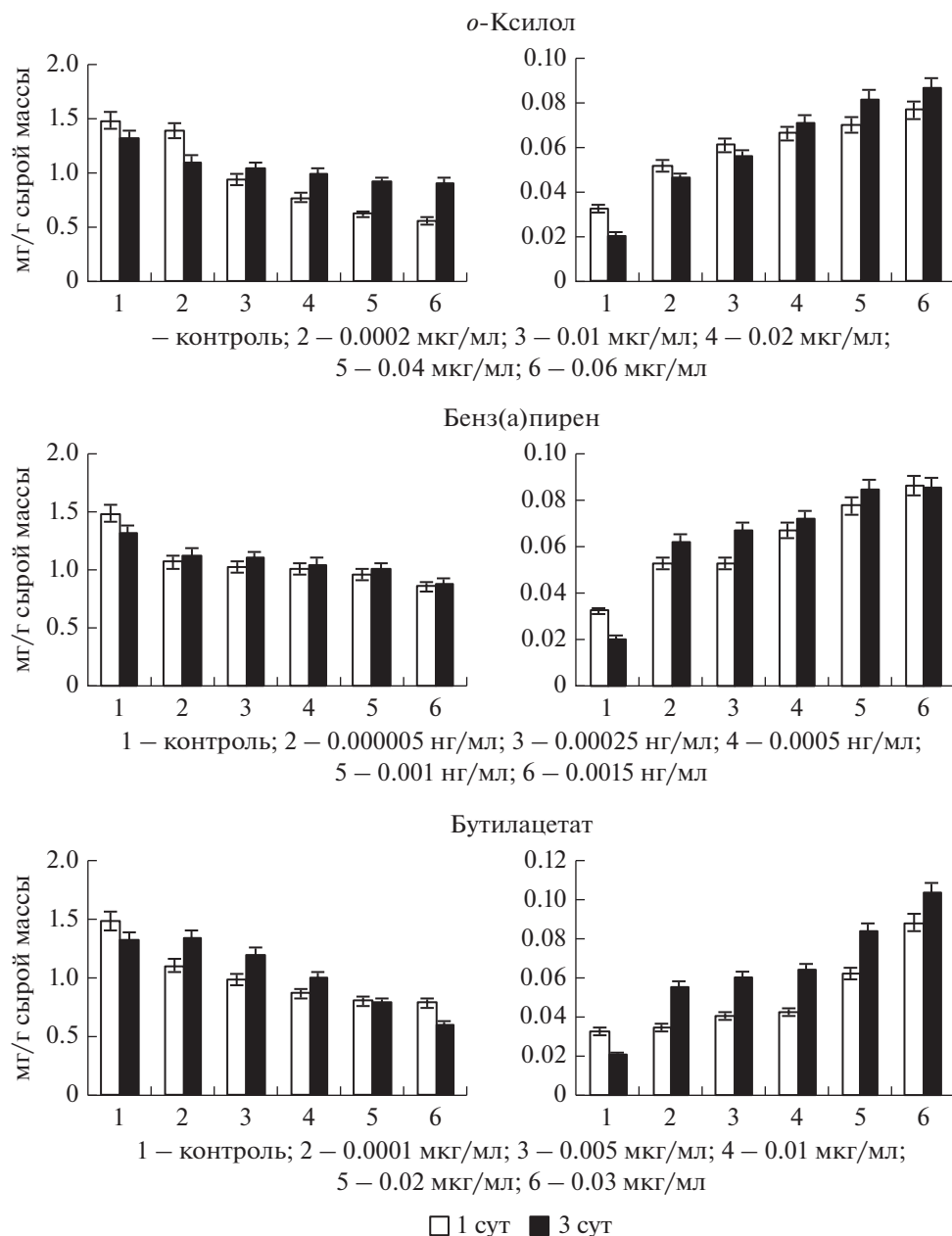


Рис. 1. Окончание

тольных пигментов. Активность действия бензола на дефитолизацию возрастала через трое суток. Известно, что особенностью поведения бензола в окружающей среде является волнообразный характер увеличения его концентрации в воздухе при максимальном уровне в первые 30 мин после выброса в атмосферу и далее через 4 ч (Бандман и др., 1990). Кроме того, бензол характеризуется слабым окислением во внешней среде. Полициклический бенз(а)пирен, обладающий высокой токсичностью, способностью к трансграничному переносу, биологической трансформации, аккумуляции в природных объектах и мутагенными

свойствами, разрушал фитольные пигменты, подобно бензолу, а по действию на содержание бесфитольных пигментов скорее напоминал *o*-ксилол (в количественном отношении).

Таким образом, наиболее интенсивное снижение содержания фитольных форм пигментов в листьях овсяницы тростниковой наблюдали через одни сутки после обработки *o*-ксилолом, а рост количества бесфитольных форм — через трое суток. Пролонгированное влияние на бесфитольные формы сохранялось и после обработки растений бенз(а)пиреном.

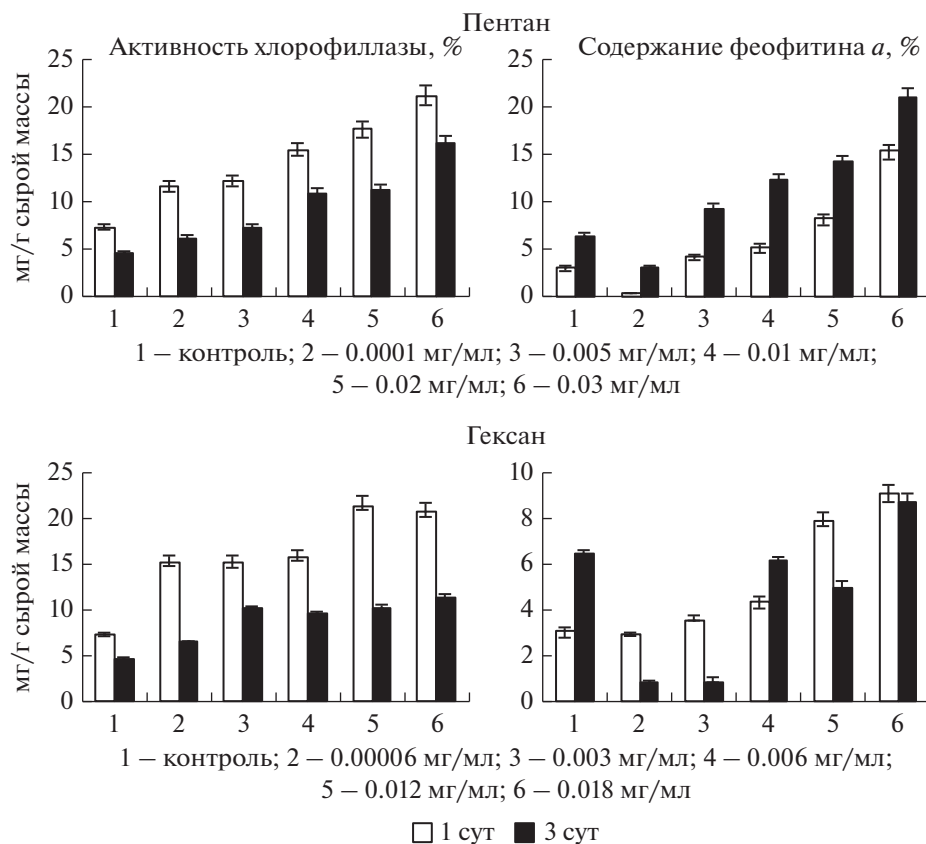


Рис. 2. Влияние алканов на активность хлорофиллазы и степень феофитинизации хлорофилла *a* в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

Содержание фитольных форм пигментов более интенсивно снижалось через одни сутки после обработки растений сравнительно небольшими концентрациями бутилацетата, в то же время увеличение содержания нативных бесфитольных форм происходило и через трое суток после обработки. Согласно данным статистической отчетности, за последние годы наблюдается резкое увеличение выбросов бутилацетата (бутилового эфира уксусной кислоты) в атмосферный воздух в результате деятельности отдельных промышленных предприятий Беларуси. Бутилацетат является одним из наиболее распространенных растворителей при получении и применении лакокрасочных материалов, он растворяет масла, жиры, хлоркаучуки, виниловые полимеры, эфиры целлюлозы и др.

Несмотря на то, что все использованные токсические соединения были гидрофобными, наиболее сильным деструктивным действием на содержание мембраносвязанных форм хлорофилловых пигментов в листьях овсяницы тростниковой обладал *o*-ксилол через одни сутки после попадания в листовые ткани.

На рис. 2–4 показано влияние различных групп органических соединений на активность хлорофиллазы и степень феофитинизации в ана-

логичных образцах овсяницы тростниковой. На осях ординат этих рисунков активность хлорофиллазы представлена как отношение содержания хлорофиллидов *a + b*, образовавшихся в результате действия хлорофиллазы, к общему содержанию хлорофиллов *a + b* (в %), а содержание феофитина *a* – как отношение содержания феофитина *a* к содержанию хлорофилла *a* (также в %). Следует отметить, что отщепление фитола от хлорофилла *a* и хлорофилла *b* – особый вопрос, обсуждаемый в литературе (Chen *et al.*, 2012), для ответа на который необходимо более точно определять содержание хлорофилла и хлорофиллида *b*, чем это сделано в нашей работе. Поэтому мы ограничиваемся при оценке активности хлорофиллазы ее суммарным действием на оба хлорофилла.

На рис. 2 более заметна обратная зависимость активности хлорофиллазы от продолжительности действия алканов, чего не скажешь о степени феофитинизации, несмотря на достаточно высокую устойчивость алканов, как было отмечено выше. Длина углеродной цепи (большая у гексана), возможно, имеет значение для феофитинизации, существенно более низкой после обработки гексаном. В целом, под действием алканов отщепление

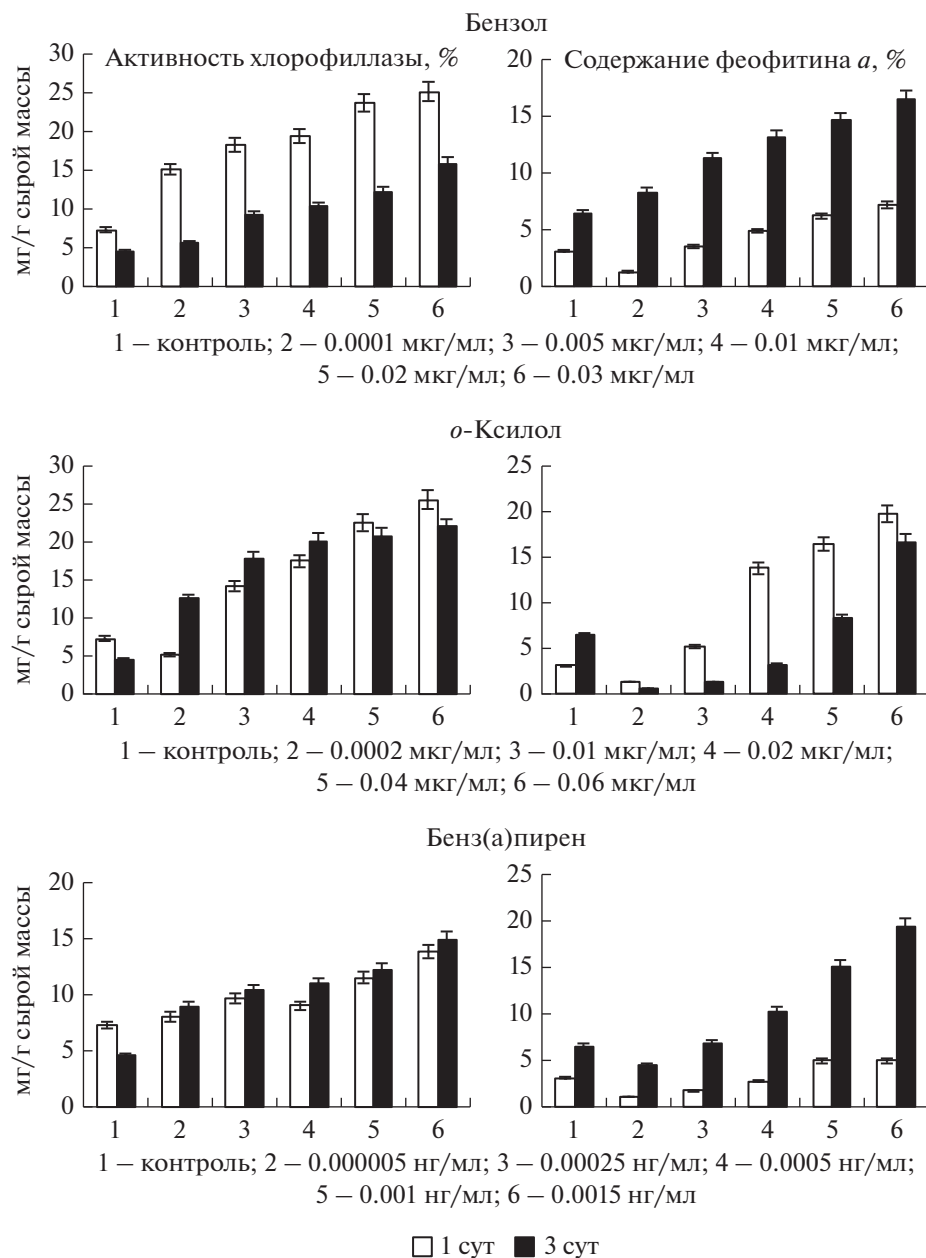


Рис. 3. Влияние ароматических углеводов на активность хлорофиллазы и степень феофитинизации хлорофилла *a* в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

фитола от молекулы хлорофилла происходило более активно по сравнению с процессом его феофитинизации в большинстве других вариантов опыта.

Результаты определения активности хлорофиллазы в эксперименте с бензолом (рис. 3) свидетельствуют о его более высокой активности как через одни, так и через три суток после обработки по сравнению с алканами. Отщепление фитола от молекул хлорофиллов под влиянием бензола происходило более интенсивно по сравнению с феофитинизацией хлорофилла *a*, особенно че-

рез одни сутки после обработки. Различия в действии бензола и *o*-ксилола, возможно, связаны с активными окислительными процессами последнего в боковой цепи.

Бенз(а)пирен, несмотря на сильное токсическое воздействие на живые организмы, в наших исследованиях был менее агрессивен, особенно спустя сутки, что особенно заметно отразилось на содержании феофитина *a* (рис. 3). Это можно было бы считать следствием его контакта с воздухом, приводящим к окислению бенз(а)пирена до хинонов и далее карбоновых кислот еще до мо-

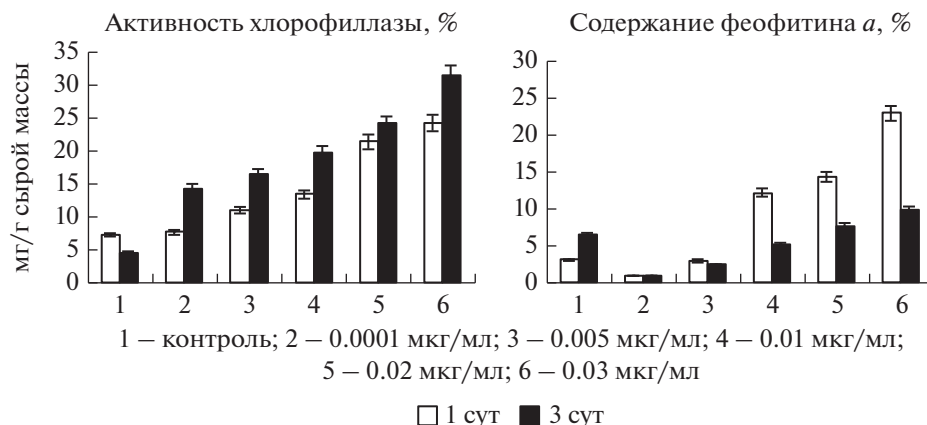


Рис. 4. Влияние сложного эфира (бутилацетата) на активность хлорофиллазы и степень феофитинизации хлорофилла *a* в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea*.

мента попадания в растительную клетку. Однако совершенно неожиданно выглядит равномерный прирост содержания феофитина *a* через трое суток после обработки.

Известно, что, как и другие сложные эфиры, бутилацетат подвергается гидролизу с образованием карбоновой кислоты и спирта (уксусной кислоты и бутилового спирта). Несмотря на возможность закисления тканей в местах контакта с токсикантом, его влияние на фитолизацию практически отсутствовало, правда, при минимальных концентрациях (рис. 4). Активность хлорофиллазы была достаточно высокой, особенно через трое суток после обработки, что свидетельствует о наличии благоприятных условий для отщепления фитила от молекулы хлорофилла при воздействии бутилацетата.

Таким образом, наиболее интенсивное накопление феофитина *a* происходило в пробах, подверженных воздействию *o*-ксилола и бутилацетата через одни сутки после их попадания в листья, тогда как через трое суток в этих же пробах наблюдалась максимально высокая активность хлорофиллазы (рис. 2–4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прижизненное содержание бесфитольных пигментов (хлорофиллидов *a + b*) (данные, приведенные на рис. 1) является результатом действия хлорофиллазы и, возможно, отражает ингибирование фермента, ответственного за включение фитила, в результате чего молекулы хлорофиллидов *a* и *b* не могут использоваться в дальнейшем метаболизме хлорофилла. В таком случае, вполне вероятно, что суммарное содержание нативного хлорофиллида (ов) в ткани листа (при разделении фитольных и бесфитольных пигментов), должно быть выше, чем обнаруживаемое нами при определении активности хлорофиллазы. Наблюдавшееся нами более низкое содержание нативных хлоро-

филлидов (*a + b*) по сравнению с количеством этого же пигмента, возникающего в результате действия хлорофиллазы, можно объяснить неоптимальными условиями для работы фермента при простой экстракции ацетоном. Расчет коэффициента корреляции между изменением содержания нативных бесфитольных пигментов и содержанием хлорофиллида, образующегося в результате хлорофиллазной реакции (табл. 1, левая колонка), указывает на наличие достаточно высокой положительной корреляции между обоими параметрами. Таким образом, участие хлорофиллазы в деструкции хлорофиллов *a* и *b* при действии токсических веществ, использованных в нашей работе, неоспоримо.

Данные, полученные нами, указывают также на участие в процессе разрушения хлорофилла *a* фермента, осуществляющего феофитинизацию. Из табл. 1 видно, что изменение содержания нативных бесфитольных пигментов для всех токси-

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между различными формами хлорофилловых пигментов

Исследуемые соединения	Коэффициенты корреляции между формами Пигментов	
	нативные бесфитольные – хлорофиллазные бесфитольные	нативные бесфитольные – феофитин <i>a</i>
Пентан	0.72*	0.40
Гексан	0.56	–0.12
Бензол	0.20	0.62*
<i>o</i> -Ксилол	0.83*	0.20
Бенз(а)пирен	0.84*	0.25
Бутилацетат	0.90*	0.15

Примечание. * Обозначены достоверные коэффициенты корреляции при $t_{st} > t_{табл}$; $t_{табл} (9) = 2.3$ при $p \leq 0.05$.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между показателями активности хлорофиллазы и содержанием феофитина *a*

Исследуемые соединения	Коэффициенты корреляции
Пентан	-0.02
Гексан	-0.06
Бензол	-0.46
<i>o</i> -ксилол	-0.04
Бенз(а)пирен	0.32
Бутилацетат	-0.08

Таблица 3. Изменение активности хлорофиллазы и относительного содержания феофитина *a* в листьях овсяницы тростниковой *F. arundinacea* в различных техногенных зонах Гомеля в процессе вегетации

Место отбора проб	Время отбора проб	Активность хлорофиллазы, %	Содержание феофитина <i>a</i> , %
Контроль	Май	4.80 ± 0.20	3.95 ± 0.15
	Июль	4.85 ± 0.21	4.01 ± 0.19
	Сентябрь	6.15 ± 0.30	4.15 ± 0.17
ОАО "ГЗЛиН"	Май	10.05 ± 0.48*	5.48 ± 0.24*
	Июль	11.85 ± 0.50*	6.42 ± 0.30*
	Сентябрь	19.24 ± 0.95*	10.11 ± 0.48*
ТЭЦ-2	Май	8.00 ± 0.35*	2.40 ± 0.11*
	Июль	9.05 ± 0.42*	2.90 ± 0.10*
	Сентябрь	11.58 ± 0.51*	7.60 ± 0.35*

Примечание. * Обозначены достоверные коэффициенты при $t_{st} > t_{табл}$; $t_{табл} (9) = 2.3$ при $p \leq 0.05$.

кантов, за исключением бензола, не коррелировало с изменением содержания феофитина *a*. Положительная корреляция не обнаружена также при сравнении активности хлорофиллазы и степени феофитинизации (табл. 2). Отсутствие корреляции между активностью этих двух процессов указывает на высокую вероятность их независимого протекания.

Таким образом, разрушение мембраносвязанных молекул хлорофиллов *a* и *b* при действии на листья овсяницы тростниковой летучих органических соединений и бенз(а)пирена осуществляется в результате корреляционно не связанных процессов удаления фитола и атома магния, что отличает наблюдаемую нами картину от механизмов разрушения хлорофиллов при старении (Syvash, Zolotareva, 2017).

В табл. 3 показано изменение активности хлорофиллазы и относительного содержания феофитина *a* в листьях овсяницы в разных техногенных условиях г Гомеля. Совершенно очевидно, что самая неблагоприятная обстановка, тестируемая по деградации хлорофилла, обнаружена вблизи завода литья и нормалей, в выбросах которого в преобладающем количестве содержатся ксилолы и бутилацетат. Особенно выразительно выглядит изменение активности хлорофиллазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты показали, что эффективным тестом на разрушительное действие токсических органических соединений является активность хлорофиллазы и степень феофитинизации хлорофилла *a* на фоне изменений общего содержания мембраносвязанных пигментов. Впервые показано, что исследованное с этой целью растение овсяницы тростниковой может служить модельным объектом для определения степени токсичности практически любой органики. Используя различные концентрации токсических веществ и разные сроки их действия, можно прогнозировать интенсивность и продолжительность их влияния на растение и окружающую среду. Кроме того, прямые показатели деградации хлорофилла могут служить тревожным сигналом при оценке техногенной обстановки вблизи любых предприятий. В целом, полученные результаты создают научную основу для разработки метода индикации загрязнения атмосферного воздуха пентаном, гексаном, бензолом, *o*-ксилолом, бенз(а)пиреном и бутилацетатом с использованием травянистых растений. Представленные данные дополняют научные представления о влиянии органических загрязнителей на процессы де-

градации хлорофилла в растительных клетках, будут полезны в методическом плане при расширении диапазона исследуемых видов растений, проведении мониторинга и экологического зонирования загрязненных территорий, разработке рекомендаций по озеленению территорий и новых экологических нормативов допустимых техногенных нагрузок на экосистемы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверина Н.Г., Шалыго Н.В., Линник Н.Н. Изучение феофитинизации хлорофилла под действием хелаторов металлов пиридинового ряда // Физиология растений. 1991. Т. 38. Вып. 6. С. 1059–1065.
- Бандман А.Л., Воитенко Г.А., Волкова Н.В., Дикун П.П., Иванова В.А., Ивин Б.А., Каган Ю.С. Кротов Ю.А., Левина Е.Н., Минкина Н.А. и др. Вредные химические вещества. Углеводороды. Галогенпроизводные углеводородов. Ленинград: Химия, 1990. 732 с.
- Савицкая Л.С. Экологический анализ адаптивных механизмов растений в урбанизированной среде: Автореф. дис. канд. биол. наук. Петрозаводск: Вят. гос. с.-х. акад., 2015. 23 с.
- Сиваш А.А., Золотарева Е.К. Катаболизм хлорофилла в растениях // Вісник Харківського національного аграрного університету. 2013. Вип. 3(30). С. 6–17.
- Шалыго Н.В. Биосинтез хлорофилла и фотодинамические процессы в растениях. Минск: ИООО “Право и экономика”, 2004. 156 с.
- Фомішина Р.М., Сиваш О.О., Захарова Т.О., Золотарева О.К. Роль хлорофілази в адаптації рослин до умов освітлення // Ukr. Botan. J. 2009. V. 66. № 1. P. 94–102.
- Araújo R.P., Almeida A.A., Pereira L.S., Mangabeira P.A.O., Souza J.O., Pirovani C.P., Ahnert D., Baligar V.C. Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil // Ecotoxicology Environ. Safety. 2017. V. 144. P. 148–157.
- Arellano P., Tansey K., Balztera H., Boyd D. Detecting the effects of hydrocarbon pollution in the Amazon forest using hyperspectral satellite images // Environ. Pollution. 2015. V. 205. P. 225–239.
- Arkus K.A.J., Cahoon E.B., Jez J.M. Mechanistic analysis of wheat chlorophyllase // Arch. Biochem. Biophys. 2005. V. 438. P. 146–155.
- Büchert A.M., Civello P.M., MartínezBüchert G.A. Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytylation during senescence of broccoli // J. Plant Physiology. 2011. V. 168. P. 337–343. <https://www.sciencedirect.com/science/journal/03088146>
- Chen M.C.M., Chao P.Y., Huang M.Y., Yang J.H., Yang Z.W., Lin K.H., Yang C.M. Chlorophyllase activity in green and non-green tissues of variegated plants // South African J. Botany. 2012. V. 81. P. 44–49. <https://www.sciencedirect.com/science/journal/03088146>
- Chen S.P., Wang S.Y., Huang M.Y., Lin K.H., Hua S.M., Lu H.H., Lai Y.C., Yang C.M. Physiological and molecular analyses of chlorophyllase in sweet potatoes with different-colored leaves // South African J. Botany. 2018. V. 114. P. 272–279. <https://www.sciencedirect.com/science/journal/03088146114>.
- Garty J., Tamir O., Levin T., Lehr H. The impact of UV-B and sulphur- or copper-containing solutions in acidic conditions on chlorophyll fluorescence in selected *Ramalina* species // Environ. Pollution. 2007. V. 145. P. 266–273.
- Harpaz-Saad S., Azoulay T., Arazi T., Ben-Yaakov E., Mett A., Shibolet Y.M. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is post-translationally regulated // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 1007–1022.
- Hoai T., Einav T., Gatic M., Esheld A., Wintersb G. Germination, physiological and biochemical responses of acacia seedlings (*Acacia raddiana* and *Acacia tortilis*) to petroleum contaminated soils? // Environ. Pollution. 2018. V. 234. P. 642–655.
- Петобayo O., Eissab F., Sakugawaa H. Negative effects of fluoranthene on the ecophysiology of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill): Fluoranthene mists negatively affected tomato plants // Chemosphere. 2010. V. 78(7). P. 877–884.
- Jiaoac L., Dingac H., Wangac L., Zhouac Q., Huangb X. Bisphenol A effects on the chlorophyll contents in soybean at different growth stages? // Environ. Pollution. 2017. V. 223. P. 426–434.
- Kang Y.R., Park J., Jung S.K., Chang Y.H. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins // Food Chemistry. 2018. V. 245. P. 943–950.
- 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.
- Kreslavski V.D., Brestic M., Zharmukhamedov S.K., Lyubimov V.Yu., Lankin A.V., Jajoo A., Allakhverdiev S.V. Mechanisms of inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in photosynthetic primary processes in pea leaves and thylakoid preparations // Plant Biol. 2017. V. 19(5). P. 683–688.
- Kusmita L., Puspitaningrum I., Limantara L. Identification, isolation and antioxidant activity of pheophytin from green tea (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze) // Procedia Chemistry. 2015. V. 14. P. 232–238.
- Lambers J.W.J., Terpstra W. Inactivation of chlorophyllase by negatively charged plant membrane lipids // Bioch. Bioph. Acta. 1985. V. 831. P. 225–235.
- Malallaha G., Afzalb M., Gulshanb S., Abraham D., Kuriamb M., Dhamic M.S.I. Vicia faba as a bioindicator of oil pollution // Environ. Pollution. 1996. V. 92. P. 213–217.
- Popek R., Przybysz A., Gawrońska H., Klamkowski K., Gawroński S.W. Impact of particulate matter accumulation on the photosynthetic apparatus of roadside woody plants growing in the urban conditions // Ecotox. Environ. Safety. 2018. V. 163. P. 56–62.
- Mosaddegh M.H., Jafarian A., Ghasemi A., Mosaddegh A. Phytoremediation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene contaminated air by *D. deremensis* and *O. microdasys* plants // J. Environ. Health Sci. Eng. 2014. V. 12. P. 39–52.

- Radojevič M., Bashkin V.N. Practical Environmental Analysis. United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2006. 466 c.
- Rydzyski D., Piotrowicz Cieslak A.I., Grajek H., Michalczyk D.J. Chlorophyll degradation by tetracycline and cadmium in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves // Intern. J. Environ. Sci. Technology. 2019. V. 16. P. 6301–6314.
- Sarah L., Honoura J., Nigel B., Trevor B., Ashendenc W., Neil J., Sally C., Powera A. Responses of herbaceous plants to urban air pollution: Effects on growth, phenology and leaf surface characteristics // Environ. Pollution. 2009. V. 157. P. 1279–1286.
- Sha Sha, Cheng M., Hu K., Zhang W., Yang Y., Xu Q. Toxic effects of Pb on *Spirodela polyrhiza* (L.): Subcellular distribution, chemical forms, morphological and physiological disorders // Ecotoxic. Environ. Safety. 2019. V. 181. P. 146–154.
- Shen Y., Li J., Gu R., Le Y., Zhan X., Xing B. Phenanthrene-triggered chlorosis is caused by elevated chlorophyll degradation and leaf moisture // Environ. Pollution. 2017. V. 220. P. 1311–1321.
- Singh G., Agnihotri R.K., Reshma R.S., Ahmad M. Effect of lead and nickel toxicity on chlorophyll and proline content of Urd (*Vigna mungo* L.) seedlings // Intern. J. Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 4. P. 136–141.
- Singh S., Singh S., Ramachandran V., Eapen S. Copper tolerance and response of antioxidative enzymes in axenically grown *Brassica juncea* (L.) plants // Ecotoxic. Environ. Safety. 2010. V. 73. P. 1975–1981.
- Syvash O.O., Zolotareva O.K. Regulation of chlorophyll degradation in plant tissues // Biotechn. acta. 2017. V. 3. № 3. P. 20–30.
- Takamiya K.I., Nishimura M. Effect of chlorophyllase treatment on photooxidation of P700 in chloroplast fragments // Bioch. Bioph. Acta. 1972. V. 283. P. 115–123.

Degradation of Chlorophyll in the Leaves of Reed Fescue (*Festuca arundinacea*) under the Action of Volatile Organic Compounds and Benz(a)pyrene

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

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

² Institute of Biophysics and Cell Engineering of the NAS of Belarus, Akademicheskaya, str. 27, Minsk, 220072 Belarus

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

The pathways of degradation of chlorophyll *a* and *b* in the leaves of reed fescue (*Festuca arundinacea*) under the action of volatile organic compounds (pentane, hexane, benzene, *o*-xylene, butyl acetate) and benz(a)pyrene were studied. As markers of the destruction of chlorophyll *a* and *b*, we used the activity of chlorophyllase, which removes phytol, and the degree of pheophytinization of chlorophyll *a*. A dose-dependent decrease in the content of membrane-bound chlorophyll pigments was found as a result of the action of all used hydrocarbons, which was most pronounced with the action of *o*-xylene one day after treatment. The destruction of pigments containing phytol occurred both by pheophytinization and by dephytolization. There was no correlation between chlorophyllase activity and the degree of pheophytinization.

Keywords: chlorophyll, reed fescue, volatile organic compounds, benz(a)pyrene, chlorophyllase, pheophytin