УДК 581.5

Оценка влияния ароматических фитотоксикантов на физиолого-биохимические показатели ассимилирующих органов *Tetrastigma voinierianum* (Baltet) Pierre ex Gagnep.

И.С. Казимиров*, Э.А. Марченко**
**Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»*
***Государственное учреждение «Республиканский центр аналитического контроля в области охраны окружающей среды»*

На основании проведенного модельного эксперимента установлен характер функциональных изменений в листьях тропической лианы Tetrastigma voinierianum (Baltet) Pierre ex Gagnep. в ответ на действие ароматических фитотоксикантов (фенола, стирола, бензола, толуола, ксилола). У изученного вида под влиянием фенола, стирола и бензола уменьшается в листьях содержание суммы хлорофиллов a и b, соответственно снижается интенсивность фотосинтеза, в то время как возрастает суммарное содержание фенольных соединений, водорастворимых белков, растворимых редуцирующих сахаров, усиливается интенсивность дыхания. Толуол и ксилол отмеченных выше достоверных изменений у растения не вызывают. Относительно изученного вида высокотоксичными являются фенол, стирол и бензол, наименьшей токсичностью обладают толуол и ксилол.

Ключевые слова: *тропические растения, лиана, устойчивость, физиологические показатели, биохимические показатели, лист, фитотоксиканты, ароматические соединения, фенол, стирол, бензол, толуол, ксилол.*

Assessment of the impact of aromatic phytotoxicants on physiological and biochemical parameters of assimilating organs of *Tetrastigma voinierianum* (Baltet) Pierre ex Gagnep.

I.S. Kazimirau*, E.A. Marchanka**
**Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»*
***State institution «Republic Center of Analytical Control in the Field of Environmental Protection»*

On the basis of the model experiment character of functional transformations in the leaves of tropical liana Tetrastigma voinierianum (Baltet) Pierre ex Gagnep was found out as a response to the impact of aromatic phytotoxicants (phenol, sterol, benzene, toluene, xylene). Under the impact of phenol, sterol and benzene reduction of the total chlorophyll a and b content in the leaves of the investigated species took place, correspondingly the photosynthesis intensity reduces while the total content of phenol compounds, water soluble proteins, soluble reducing sugars increased as well as the intensity of breathing. Toluene and xylene do not cause the above mentioned trustworthy transformations of plants. Regarding the investigated species highly toxic are phenol, sterol and benzene, while toluene and xylene are least toxic.

Key words: *tropical plants, liana, resistance, physiological parameters, biochemical parameters, leaf, phytotoxicants, aromatic compounds, phenol, sterol, benzene, toluene, xylene.*

Фитотоксиканты ароматической природы могут выступать не только как ингибиторы или стимуляторы ростовых процессов, но и влиять на накопление в тканях растений определенных групп соединений вторичного метаболизма. Последнее приводит к повышению или ослаблению устойчивости вида к воздействию неблагоприятных факторов среды [1]. Растительный организм вырабатывает определенные механизмы устойчивости относительно ксенобиотиков. Так, степень устойчивости растений к воздействию фенола может повышаться как в результате интенсификации синтеза аминокислот, так и в результате гидролиза белковых молекул. Накопление аминокислот в этом случае представляет собой необходимое условие усиления белоксинтетической активности. Однако значение аминокислот в приобретении растением устойчивости является косвенным, поскольку определяется участием в биосинтезе белка [2–3].

Детоксикация фенола в листьях устойчивых видов растений осуществляется благодаря адсорбции его на поверхности структур клеток

Репозиторий ВГУ

и растворению в липидах. При достижении определенного уровня аккумуляции данного ксенобиотика в клетках он приводит к их гибели. В листьях неустойчивых видов растений фенол окисляется ферментами до хинонов (высокотоксичный яд). Последние вступают в необратимые реакции с SH- и NH_2-группами белков, что приводит к гибели клеток [4].

В детоксикации ксенобиотиков особую роль выполняют соединения, способные к конъюгации фенолов в растениях. Установлена возможность образования в процессе детоксикации фенола продуктов с сохранением ароматического ядра. Особую роль в конъюгации с фенолами играют пептиды. Фенол-пептидные продукты сочетания являются результатом детоксикации [5–6].

Целью работы является оценка влияния ароматических фитотоксикантов (фенола, стирола, бензола, толуола, ксилола) на физиолого-биохимические показатели ассимилирующих органов *Tetrastigma voinierianum* (Baltet) Pierre ex Gagnep.

Материал и методы. Объект исследования – тропическая лиана тетрастигма Вуанье (*Tetrastigma voinierianum* (Baltet) Pierre ex Gagnep.). Предмет исследования: физиолого-биохимические показатели жизнедеятельности листа (сумма хлорофиллов *a* и *b*, сумма фенольных соединений, белки водорастворимые, сахара растворимые редуцирующие, интенсивность фотосинтеза и дыхания); газоустойчивость растения по отношению к ароматическим соединениям (фенолу, стиролу, бензолу, толуолу, ксилолу).

Растения для эксперимента получены в результате стеблевого черенкования маточных растений из одной коллекции. В исследовании использовали одновозрастные 3-месячные почвенные культуры *Tetrastigma voinierianum*, выращенные на универсальном питательном грунте «Флорабел-5» («ФЛОРАБЕЛ», Беларусь); ТУ РБ 14724724.002-99. Физико-химические показатели грунта, согласно данным производителя: влага – 45–60%; кислотность – 5,8–7,2 pH; содержание водорастворимых солей – 1,2–4,0 г/дм^3; содержание подвижных форм питательных элементов: азот (N) – 130±40, фосфор (P_2O_5) – 130±40, калий (K_2O) – 170±50 мг/100 г абсолютно сухого вещества.

С целью фумигации ароматическими соединениями использовали стеклянные боксы объемом 40 дм^3 с боковым отверстием. В качестве уплотнителя применяли поролон (уплотнение между стенкой и стеблями побегов). На внутреннюю поверхность бокса равномерным слоем на площади 5 см^2 микропипеткой наносили расчетное количество определенного ароматического соединения на расстоянии не менее 20 см от поверхности листьев растений. Необходимое количество ароматического соединения рассчитывали исходя из концентрации 5 ПДК: фенол – 1,5, стирол – 150, бензол – 75, толуол – 750, ксилол – 250 мг/м^3 [7]. Время экспозиции составляло трое суток. Режим освещения естественный, ориентация окон юго-восточная, освещенность 2500–4000 лк; температура воздуха 18–20°С. Контрольные растения размещали в боксе при таком же режиме освещения и температуры. Физиолого-биохимические исследования листьев среднего яруса проводили на 3-и и 15-е сутки от начала эксперимента и у вновь образованных после фумигации листьев.

Сумму хлорофиллов *a* и *b* определяли спектрофотометрическим методом. Измерение оптической плотности полученных экстрактов (экстраген – 80%-ный ацетон) осуществляли на спектрофотометре СФ-26 («ЛОМО», Россия). Определение суммы фенольных соединений осуществляли спектрофотометрически с использованием реактива Фолина–Дениса. Водорастворимые белки определяли колориметрическим методом по Лоури с помощью концентрационного фотоэлектрического колориметра КФК-2МП («ЗОМЗ», Россия). Растворимые редуцирующие сахара определяли по Бертрану [8]. Интенсивность фотосинтеза и дыхания определяли газометрическим методом [9]. Измерения осуществляли в 30-кратной повторности.

Статистическую обработку полученных данных проводили, используя рекомендации Г.Ф. Лакина [10], на персональном компьютере с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.0. Вариационная статистика включала расчет среднего арифметического (M) и его ошибки (±m). Достоверность различий показателей опыта относительно контроля оценивали по t-критерию Стьюдента при 95%-ном уровне доверительной вероятности.

Результаты и их обсуждение. Полученные в работе результаты являются продолжением исследования устойчивости растений тропической и субтропической флоры по отношению к фитотоксикантам ароматического ряда [11–13]. Данные по изменению некоторых физиолого-биохимических показателей листьев *Tetrastigma voinierianum* под влиянием ароматических соединений представлены в табл., исходя из которой видно, что пигментный комплекс листьев подвержен негативному влиянию исследуемых

Репозиторий ВГУ

фитотоксикантов. Так, на 3-и сутки экспозиции в опыте с фенолом, стиролом и бензолом в листьях отмечено уменьшение содержания суммы хлорофиллов относительно контроля на 31,10, 28,84 и 27,76% соответственно. На 15-е сутки восстановление содержания в листьях хлорофилла в значительной степени отстает от восстановления содержания в листовой пластинке фенольных соединений. Так, содержание хлорофилла в опытах с фенолом, стиролом и бензолом продолжает оставаться пониженным по отношению к контролю на 33,33, 31,09 и 26,63% соответственно. В то же время толуол и ксилол на 3-и и 15-е сутки в сравнении с контролем вызывают незначительное снижение содержания хлорофилла, которое не является достоверным.

По всей вероятности, резкий скачок в повышении концентрации фенолов в тканях не только листьев, но и апикальной меристемы приводит к существенному снижению суммарного содержания хлорофиллов в молодых листьях, которые закладываются сразу же после проведенных фумигаций. Относительно контроля содержание в них хлорофилла более низкое, чем на 3-и и 15-е сутки в листьях с оформленным фотосинтетическим аппаратом в вариантах с фенолом (на 42,21%), стиролом (на 37,73%) и бензолом (на 37,44%). Уменьшение величины данного показателя под влиянием толуола и ксилола по отношению к контролю незначительно.

Под воздействием фенола, стирола и бензола у *Tetrastigma voinierianum* на 3-и сутки заметно возрастает доля фенольных соединений, что в сравнении с контролем составляет соответственно 33,56, 28,08 и 24,66%. На 15-е сутки наблюдается в значительной степени восстановление уровня содержания этих соединений у опытных растений относительно контрольных, однако он остается еще достаточно высоким. Так, в варианте с фенолом сумма фенольных соединений по отношению к контролю увеличена на 21,09%, со стиролом – на 18,37%, а с бензолом – на 15,65%. Повышенное содержание исследуемого показателя отмечается и в молодых листьях растений в опытах с фенолом, стиролом и бензолом соответственно на 17,36, 15,97 и 13,89% по отношению к контролю. Вероятно, фумигация листьев приводит не только к изменению проницаемости биомембран, смещению pH цитоплазмы в сторону ее подкисления, но и к значительному увеличению концентрации фенольных соединений. Все перечисленное является причиной изменения фотосинтетического аппарата, и прежде всего суммарного содержания хлорофиллов. Толуол и ксилол таких существенных изменений в биохимическом составе тканей листа относительно контрольной группы растений не вызывают.

В вариантах с фенолом, стиролом и бензолом на 3-и сутки у *Tetrastigma voinierianum* отмечается повышение концентрации водорастворимых белков по сравнению с контролем (соответственно на 20,20, 19,18 и 6,90%). На 15-е сутки сохраняются высокие значения исследуемого показателя относительно контроля в опытах с фенолом, стиролом и бензолом на 20,86, 19,85 и 7,89% соответственно. У вновь образованных листьев отмечается не столь высокая разница в содержании водорастворимых белков в сравнении с контролем, что говорит об их адаптивной роли. Скорее всего, физиологическая значимость белков в большей степени сводится к образованию у изучаемого вида конъюгатов до включения механизма метаболической детоксикации исследуемых фитотоксикантов. В вариантах опыта с толуолом и ксилолом у изучаемого вида растения не обнаруживается таких скачков в повышении содержания водорастворимых белков – отсутствует достоверность полученных результатов относительно контроля.

Концентрация растворимых редуцирующих сахаров в листьях *Tetrastigma voinierianum* увеличивается в вариантах с фенолом, стиролом и бензолом соответственно на 3-и сутки: на 17,70, 15,63 и 11,65% относительно контроля. На 15-е сутки наблюдается дальнейшее повышение содержания сахаров (соответственно на 22,67, 19,04 и 13,08% в сравнении с контролем), что указывает на гидролитическую реакцию в ответ на воздействие данных ароматических соединений. В новых листьях хотя и отмечается в некоторой степени восстановление в содержании данных веществ у опытных растений по отношению к контролю, однако оно является незначительным. Так, в варианте с фенолом концентрация сахаров относительно контроля выше на 16,67%, со стиролом – на 13,30%, а с бензолом – на 10,67%. Относительно контроля изменения в содержании сахаров в вариантах с толуолом и ксилолом недостоверны. Анализируя результаты исследований по содержанию растворимых редуцирующих сахаров, можно отметить, что повышение их концентрации является важным механизмом в сохранении тургисцентности тканей листа, что существенно при регуляции зияния устьичного аппарата в целях ограничения поступления в лист токсических веществ.

Репозиторий ВГУ

Таблица

Изменение некоторых физиолого-биохимических показателей листьев *Tetrastigma voinierianum* (Baltet) Pierre ex Gagnep. под воздействием ароматических соединений

Показатель	Вариант	Значение показателей (M±m)		
		на 3-и сутки	на 15-е сутки	новые листья
Хл *a*+*b*, мг% АБС	Контроль	41,71±1,29	41,04±1,27	40,63±1,21
	Фенол	28,74±0,83*	27,36±0,79*	23,48±0,69*
	Стирол	29,68±0,85*	28,28±0,83*	25,30±0,73*
	Бензол	30,13±0,88*	30,11±0,85*	25,42±0,75*
	Толуол	38,87±1,08	39,26±1,14	39,72±1,16
	Ксилол	39,23±1,12	39,87±1,18	40,05±1,19
Сумма фенольных соединений, % АБС	Контроль	1,46±0,03	1,47±0,04	1,44±0,03
	Фенол	1,95±0,06*	1,78±0,06*	1,69±0,05*
	Стирол	1,87±0,05*	1,74±0,05*	1,67±0,05*
	Бензол	1,82±0,05*	1,70±0,05*	1,64±0,04*
	Толуол	1,51±0,04	1,49±0,04	1,47±0,03
	Ксилол	1,48±0,03	1,47±0,04	1,45±0,03
Белки водорастворимые, % АБС	Контроль	3,91±0,08	3,93±0,09	4,06±0,10
	Фенол	4,70±0,12*	4,75±0,13*	4,72±0,12*
	Стирол	4,66±0,11*	4,71±0,13*	4,68±0,12*
	Бензол	4,18±0,09*	4,24±0,11*	4,22±0,11
	Толуол	3,95±0,08	3,98±0,10	4,09±0,11
	Ксилол	3,93±0,08	3,96±0,09	4,08±0,10
Сахара растворимые редуцирующие, % АБС	Контроль	6,78±0,24	6,88±0,25	6,84±0,24
	Фенол	7,98±0,28*	8,44±0,30*	7,98±0,29*
	Стирол	7,84±0,27*	8,19±0,29*	7,75±0,28*
	Бензол	7,57±0,26*	7,78±0,28*	7,57±0,27*
	Толуол	7,00±0,25	7,09±0,27	6,96±0,26
	Ксилол	6,92±0,25	7,04±0,26	6,93±0,25
Интенсивность фотосинтеза, мг CO_2/дм^2·ч	Контроль	30,17±0,63	30,14±0,65	31,18±0,67
	Фенол	25,32±0,52*	25,43±0,53*	26,05±0,56*
	Стирол	25,48±0,54*	25,65±0,56*	26,18±0,58*
	Бензол	26,81±0,56*	27,11±0,58*	28,45±0,60*
	Толуол	28,62±0,61	28,69±0,61	29,88±0,62
	Ксилол	29,44±0,62	29,46±0,63	30,81±0,64
Интенсивность дыхания, мг CO_2/дм^2·ч	Контроль	8,54±0,21	8,61±0,22	8,95±0,24
	Фенол	10,55±0,27*	10,18±0,25*	10,39±0,26*
	Стирол	10,41±0,26*	10,08±0,24*	10,29±0,26*
	Бензол	10,11±0,25*	9,87±0,23*	10,04±0,25*
	Толуол	8,76±0,23	8,68±0,22	8,99±0,24
	Ксилол	8,71±0,22	8,64±0,22	8,97±0,24

Примечание: ошибки средних арифметических не превышают 5%; * – статистически достоверные различия в сравнении с контролем ($p<0,05$); n=10.

Репозиторий ВГУ

Интенсивность фотосинтеза листьев *Tetrastigma voinierianum* в значительной степени подавляется ароматическими фитотоксикантами. Так, под воздействием фенола, стирола и бензола на 3-и сутки она оказалась ниже контрольного варианта на 16,08, 15,55 и 11,14% соответственно. На 15-е сутки данный показатель снижен в сравнении с контролем в варианте с фенолом на 15,63%, со стиролом – на 14,90%, а с бензолом – на 10,05%. Примечателен тот факт, что и у новых листьев, не подвергавшихся прямому воздействию ароматических аэрополлютантов, отмечается подавление интенсивности фотосинтеза в сравнении с контрольными растениями (под воздействием фенола на 16,45%, стирола – на 16,04%, а бензола – на 8,76%). Это говорит о значительной амплитуде ответной реакции данного вида растения

на стрессовый фактор. Величина интенсивности фотосинтеза во всех вариантах опыта с толуолом и ксилолом относительно контроля оказалась недостоверной.

На 3-и и 15-е сутки отмечается увеличение интенсивности дыхания относительно контроля в вариантах с фенолом, стиролом и бензолом: соответственно на 23,54 и 18,23%, 21,90 и 17,07%, 18,38 и 14,63%), что связано, скорее всего, с интенсификацией гидролитических процессов, которые привели в первую очередь к повышению в тканях содержания растворимых редуцирующих сахаров. Отмеченная тенденция сохраняется и у вновь сформированных листьев опытных растений в сравнении с контрольными. По интенсивности дыхания относительно контрольной группы растений в вариантах с толуолом и ксилолом достоверность отсутствует, аналогично как и по содержанию сахаров.

Заключение. Проведенная оценка влияния ароматических фитотоксикантов на физиолого-биохимические показатели ассимилирующих органов *Tetrastigma voinierianum* выявила определенные закономерности. В функциональном плане у изученного в условиях модельного эксперимента вида растения под воздействием фенола, стирола и бензола отмечается достоверное уменьшение содержания суммы хлорофиллов *a* и *b*, соответственно снижается интенсивность фотосинтеза, возрастает суммарное содержание фенольных соединений, водорастворимых белков, растворимых редуцирующих сахаров, усиливается интенсивность дыхания. Толуол и ксилол отмеченных выше достоверных изменений у растения не вызывают. Следовательно, по отношению к изученному виду высокотоксичными являются фенол, стирол и бензол, наименьшей токсичностью обладают толуол и ксилол.

Работа поддержана грантом «Наука М» Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (договор № Б11М-142 на выполнение НИР по теме «Экологическая устойчивость растений тропической и субтропической флоры в условиях производственных интерьеров предприятий машиностроительной отрасли», № госрегистрации 20114653).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гетко, Н.В. Растения в техногенной среде: структура и функция ассимиляционного аппарата / Н.В. Гетко. – Минск: Наука и техника, 1989. – 208 с.
2. Игнатенко, А.А. Ответные реакции в аминокислотном обмене растений на действие и последействие фенола / А.А. Игнатенко // Экологические и физиолого-биохимические аспекты антропотолерантности растений: тез. докл. всесоюз. конф., Таллин, 3–5 дек. 1986 г.: в 2 ч. / Акад. наук Эст. ССР, Таллин. ботан. сад; ред.: Л. Мартин, Э. Нильсон. – Таллин, 1986. – Ч. 2. – С. 75–76.
3. Игнатенко, А.А. Роль свободных аминокислот в адаптации растений к промышленному загрязнению / А.А. Игнатенко // Актуальные задачи физиологии и биохимии растений в ботанических садах СССР: тез. докл. всесоюз. совещ., Звенигород, 14–16 окт. 1984 г. / Акад. наук СССР, Гл. ботан. сад; редкол.: Л.Н. Андреев (отв. ред.) [и др.]. – Пущино, 1984. – С. 68–69.
4. Коршиков, И.И. Фитотоксичность фенольных ингредиентов загрязнения окружающей среды: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.12 / И.И. Коршиков; Вильнюс. гос. ун-т. – Вильнюс, 1981. – 24 с.
5. Арзиани, Б. Хинон-аминокислотное взаимодействие в процессе детоксикации экзогенных простых фенолов / Б. Арзиани, Т.И. Митаишвили // Проблемы аграрной науки: сб. науч. ст. / Груз. гос. аграр. ун-т, Арм. с.-х. акад. – Тбилиси, 1999. – С. 122–125.
6. Угрехелидзе, Д.Ш. О продуктах конъюгации фенола в растениях / Д.Ш. Угрехелидзе, Т.И. Митаишвили, Д.И. Чрикишвили // Метаболизм химических загрязнителей биосферы в растениях: сб. ст. / Акад. наук Груз. ССР, Ин-т биохимии растений. – Тбилиси, 1979. – С. 43–49.
7. Перечень регламентированных в воздухе рабочей зоны вредных веществ: СанПиН № 11-19-94: утв. гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь, 9 марта 1994 г. // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / Респ. центр гигиены и эпидемиологии, Белорус. науч.-исслед. санитар.-гигиен. ин-т; сост.: Г.Е. Косяченко, А.В. Ракевич, К.С. Ляшенко; под общ. ред. В.Г. Жуковского. – Минск, 1994. – Ч. 2. – С. 3–102.
8. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков [и др.]; под общ. ред. А.И. Ермакова. – 3-е изд. – Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – 429 с.
9. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу: учеб. пособие / В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2003. – 253 с.
10. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. – 4-е изд. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
11. Казимиров, И.С. Эколого-биологические аспекты устойчивости *Cissus rhombifolia* Vahl к ароматическим соединениям / И.С. Казимиров, Э.А. Марченко // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова»: сб. науч. ст. / Витеб. гос. ун-т; редкол.: А.В. Русецкий (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2006. – Т. 5. – С. 241–252.
12. Казимиров, И.С. Устойчивость плюща обыкновенного (*Hedera helix* L.) к воздействию стирола / И.С. Казимиров // Региональные проблемы экологии: пути решения: тез. докл. II Междунар. экол. симп., Полоцк, 2–3 сент. 2005 г.: в 2 т. / Полоцк. гос. ун-т; редкол.: В.К. Липский (пред.) [и др.]. – Полоцк, 2005. – Т. 1. – С. 70.
13. Казимиров, И.С. Устойчивость некоторых тропических и субтропических растений к воздействию бензола / И.С. Казимиров // Сахаровские чтения 2005 года: экологические проблемы XXI века: материалы V Междунар. науч. конф., Минск, 20–21 мая 2005 г.: в 2 ч. / Междунар. гос. экол. ун-т; под общ. ред. С.П. Кундаса, А.Е. Океанова, В.Е. Шевчука. – Гомель, 2005. – Ч. 1. – С. 210–211.

Поступила в редакцию 30.03.2012. Принята в печать 16.04.2012
Адрес для корреспонденции: e-mail: kazimirau@gmail.com – Казимиров И.С.

Репозиторий ВГУ