

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

ВЫБОР ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ФИТОИНДИКАТОРА ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Д.И. Орехов, Г.А. Калабин

Российский университет дружбы народов
Подольское шоссе, 8/5, Москва, Россия, 113093

Рассматриваются основные изменения параметров флуоресценции фотосинтетического аппарата древесных пород (береза, липа, туя, ель) под влиянием загрязнения в г. Москве.

Ключевые слова: флуоресценция, хлорофилл, квантовый выход, фотосинтез, относительный электронный транспорт.

Изучение параметров флуоресценции хлорофилла в коре деревьев открывает возможности быстрого тестирования изменений физиологического состояния древесных насаждений под действием антропогенных факторов в больших городах. Включение этого метода в системы урбомониторинга позволит прогнозировать как состояние городских посадок в целом, так и отдельных деревьев. Последнее очень важно для своевременного проведения «оздоровительных процедур» городских насаждений путем изменения маршрутов движения транспорта, административного воздействия на предприятия-загрязнители или ослабления стрессовых нагрузок путем использования природных препаратов-адаптогенов (гуминовых веществ). Весьма важно, что мониторинг флуоресценции хлорофилла позволяет проводить работу в течение периода, значительно превышающего вегетационный сезон. Перспективность применения биофизических методов в экологических исследованиях определяется возможностью работать на интактных растениях и получать объективную информацию о большом числе растений в короткие сроки [1—5]. Высокая чувствительность методов регистрации флуоресценции позволяет надежно регистрировать сигнал от вегетативных органов интактного растения.

В статье рассматриваются вопросы изучения основных изменений флуоресцентных параметров под влиянием загрязнения в условиях г. Москвы. Основной задачей было выявление наиболее чувствительного к загрязнению вида-индикатора среди всех рассматриваемых деревьев.

Объект исследования и методика проведения измерений

Объект исследования — деревья, произрастающие в районе высокого загрязнения атмосферы выхлопными газами автомобильного транспорта (Дмитровское шоссе, ул. 800-летия Москвы, район метро «Достоевская») и в районе относительно пониженного загрязнения (контрольный район) (ул. Ивана Сусанина, возле пруда). Для исследований были выбраны две лиственные породы деревьев (липа, береза) и две хвойные породы (туя, ель).

Исследования проводились в разное время на флуориметрах, регистрирующих параметры как замедленной флуоресценции (относительный параметр замедленной флуоресценции ОПЗФ, нулевая флуоресценция — F_0), так и быстрой флуоресценции (относительный электронный транспорт ETR , фотохимическое тушение qP , нефотохимическое тушение NPQ , квантовый выход F_v/F_m).

Параметры замедленной флуоресценции регистрировались на приборе «Фотон-10» — флуориметре, разработанном на кафедре экотоксикологии Сибирского федерального университета (г. Красноярск) Ю.С. Григорьевым. Данные замеров замедленной флуоресценции были получены весной 2013 г.

Параметры быстрой флуоресценции регистрировались на кафедре биофизики МГУ с помощью портативного флуориметра РАМ-210 (Walz, Германия). Бралась побеги (в количестве не менее 5 шт.) с каждого вида и помещались в сосуд с водой. Через 12 часов непосредственно перед началом анализа у побегов отделялся участок коры (0,5—1,5 см²) с одного и того же места по длине. Замеры быстрой флуоресценции проводились весной 2010—2012 гг. Все результативные значения за каждый месяц усреднялись:

$$\bar{X} = \sum \frac{X_i}{n},$$

где \bar{X} — среднее значение параметра флуоресценции для каждого измерения; X_i — значения тест-параметра в i -том измерении; n — количество параллельных измерений.

Результаты измерений и их обсуждение

Значения начальной флуоресценции F_0 , полученные на Фотоне-10, показаны на рис. 1. Значения F_0 , полученные на РАМ-210, показаны на рис. 2. Значения параметра были усреднены. Они показывают, что у липы значения хлорофилла по обоим методам минимальны: и по значениям замедленной флуоресценции, и по значениям быстрой флуоресценции. Характерен большой разброс значений у хвойных растений по сравнению с лиственными, особенно по замедленной флуоресценции, величина которых пропорциональна количеству хлорофилла у растений. Квантовый выход показывает долю использованной энергии света растениями для реакций фотосинтеза, т.е. это своего рода КПД клетки растения, способность улавливать и направлять энергию света в процесс синтеза необходимых растению веществ (углеводов). Чем больше значение квантового выхода, тем больший процент энергии улавливается растениями для фотосинтеза. У растений, произрастающих в экологически благоприятных районах, данный показатель бывает достаточно высоким 0,7—0,8, что соответствует эффективному улавли-

ванию энергии света на 70—80%. Однако, например, при действии ингибитора на хлорофилл или любого загрязняющего вещества этот показатель снижается до значений 0,2—0,1, что соответствует очень глубокому подавлению фотосинтеза, практически минимальному уровню [1].

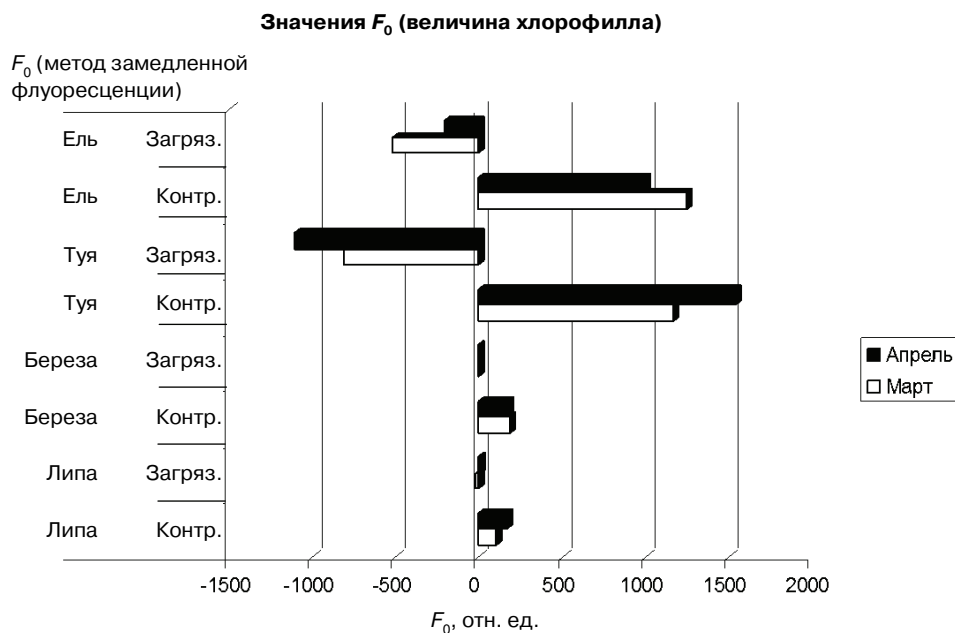


Рис. 1. Величина хлорофилла для хвойных пород (туя, ель) и лиственных пород (липа, береза) на контрольном участке и в загрязненном районе на «Фотоне-10»

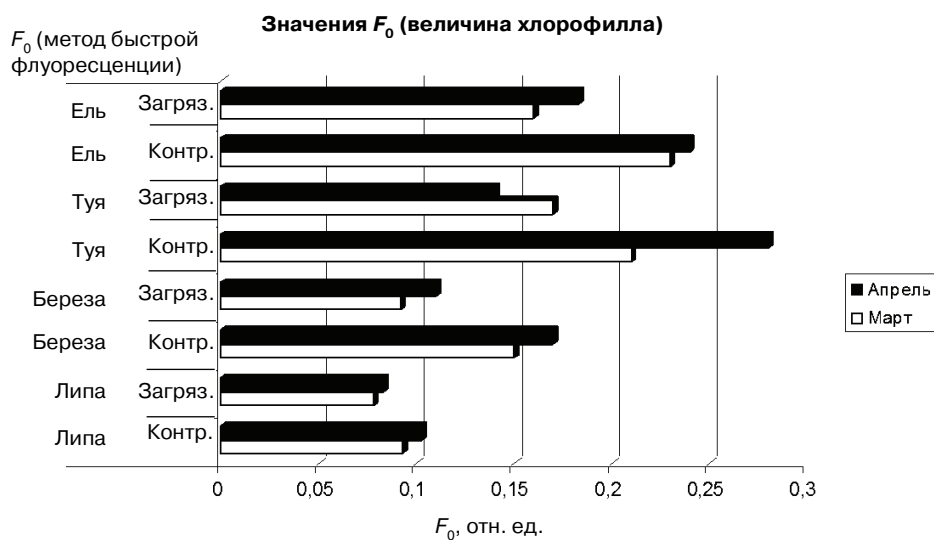


Рис. 2. Величина хлорофилла для хвойных пород (туя, ель) и лиственных пород (липа, береза) на контрольном участке и в загрязненном районе (РАМ-210)

Разброс между контрольным и загрязненным районами незначительно отличается у березы среди лиственных и у ели среди хвойных пород; у липы и туи, напротив, значения варьируют сильнее (рис. 3), что дает основание предположить, что именно липа с туей являются более чувствительными к загрязнению породами. Рассмотрим характер световых кривых (light curves) на примере этих растений с тем, чтобы выявить эту разницу детальнее.

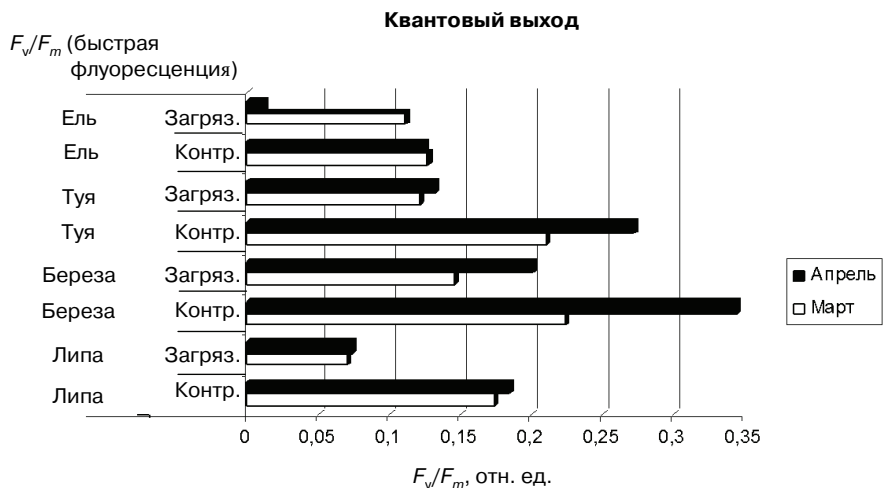


Рис. 3. Параметр квантового выхода, характеризующий быструю флуоресценцию для лиственных (липа, береза) и хвойных (туя, ель) пород в загрязненном месте и на контрольном участке

Разница между всеми породами примерно одинаковая в квантовом выходе, но максимумы флуоресценции у липы и ели схожие (составляют 0,43 и 0,38 в контроле и 0,29 и 0,23 соответственно в загрязненных местах) (рис. 4—7). Получается разница в квантовом выходе у липы и ели 0,14 и 0,15 соответственно. У туи и березы значения ниже (0,134 и 0,18 в контроле, 0,09 и 0,14 в загрязненном районе) и разница также меньше (береза — 0,04, туя — 0,038). Большая разница в значениях квантового выхода у липы и ели говорит о большой индивидуальной чувствительности к загрязнению этих видов по сравнению с туей и березой, у которых в данном случае одинаковая разница, что связано с пребыванием в состоянии покоя, так как значения квантового выхода низкие.

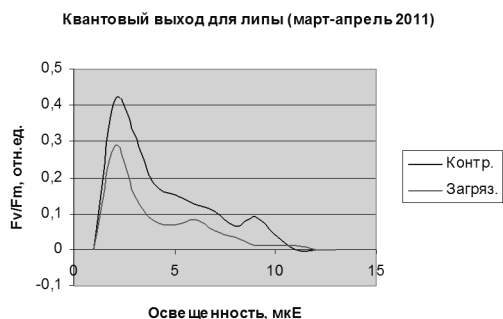


Рис. 4. Величина квантового выхода для липы в контрольном и в загрязненном районе



Рис. 5. Величина квантового выхода для туи в контрольном и в загрязненном районе



Рис. 6. Величина квантового выхода для березы в контрольном и в загрязненном районе



Рис. 7. Величина квантового выхода для ели на контрольном участке и в загрязненном районе

Значения относительного параметра замедленной флуоресценции ОПЗФ, определенные на «Фотоне-10» в марте—апреле 2013 г. как отношение замедленной флуоресценции на высоком свете к значению замедленной флуоресценции на низком свете (V/H), показаны на рис. 8. Дело в том, что измерение свечения каждой кюветы проводится для двух заранее установленных световых и временных режимов. Когда происходит нарушение целостности мембран хлоропластов при снижении фотосинтетического транспорта электронов в силу невозможности создания протонного градиента протонов на мембране тилакоидов амплитуда быстрых компонент значительно снижается. В режиме низкого света свечения в основном представлено медленными компонентами затухания замедленной флуоресценции, интенсивность которых зависит от окислительно-восстановительного состояния первичного акцептора фотосистемы двух хлоропластов. В результате при подавлении фотосинтетического транспорта электронов отношение двух параметров замедленной флуоресценции снижается в несколько раз при неблагоприятном воздействии на растительный тест-организм [2].

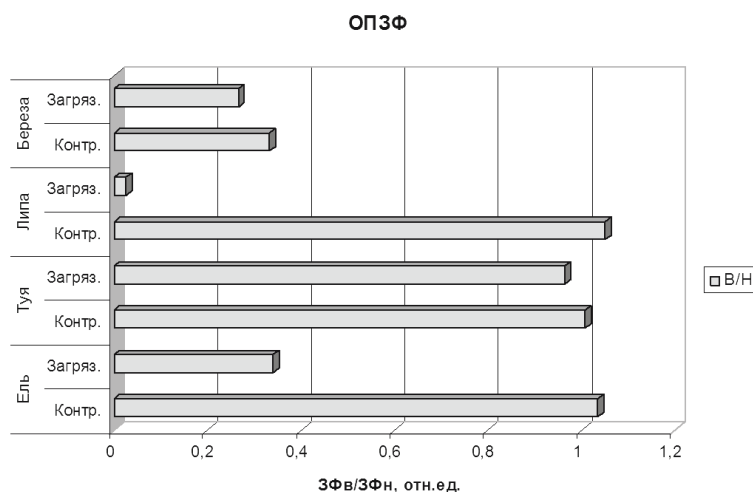


Рис. 8. Усредненная величина относительного параметра замедленной флуоресценции (ОПЗФ) для лиственных растений (липа, береза) и для хвойных растений (туя, ель) в контрольном (контр.) и в загрязненном районах (гряз.)

По значениям усредненной величины ОПЗФ можно выделить липу и ель, причем разница для контрольного и загрязненного районов у липы больше, чем у ели. У туи и березы эта разница не столь большая. Значения у всех пород не превышают 1,1 отн. ед., что соответствует состоянию покоя растений.

Параметр электронного транспорта определяет интенсивность транспортного движения электронов ETR в цепи переносчиков пластохинона. При определенном уровне освещения клеток листа (феллодермы) активизируется транспорт электронов в реакционных центрах хлорофилла, хотя при избыточном освещении реакционные центры закрываются, и перенос электронов снижается. По значениям ETR при интенсивности света 46 мкЕ выявлены дополнительные различия с фоном в условиях загрязнения (табл. 1).

Таблица 1

**Значения скорости электронного транспорта
в различных условиях загрязнения (март-апрель 2011 г.)**

Вид	Липа		Ель		Туя		Береза	
	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.
ETR	1,8	1,4	4,4	2,8	2,4	0,9	1,6	1,3
ETR_k-ETR_z	0,4		1,6		1,5		0,3	
Угол наклона	0,039	0,030	0,095	0,060	0,052	0,019	0,034	0,028

Очевидно, что у хвойных пород (ель, туя) значения разницы в 5 раз выше (1,6—1,5), чем у лиственных (липа, береза). Эти значения были усреднены. Более активный транспорт электронов в клетках хвойных пород связан с более высоким функционированием фотосинтеза в условиях покоя у голосеменных, чем у лиственных пород. Липа с березой идентичны (0,1 отн. ед.) состоянию туи с елью по уровню относительного электронного транспорта (ETR). Угол наклона представляет собой начальную величину электронного транспорта как соотношение:

$$F_v \times 0,5 / F_m,$$

где F_v — переменная флуоресценция ($F_v = F_m - F_0$), F_m — максимальная флуоресценция.

Рассмотрим еще два параметра быстрой флуоресценции: фотохимическое тушение (qP) и нефотохимическое тушение (qN). Сравнение этих параметров показывает, какой вид более чувствителен к загрязнению. Фотохимическое тушение определяет вероятность оттока электронов для протекания фотосинтетических реакций, эта доля электронов, восстанавливающих молекулы NADH и АТФ. Этот параметр (qP) увеличивается в районах с более благоприятной средой (табл. 2).

Таблица 2

Значения фотохимического тушения в различных условиях загрязнения

Вид	Липа		Ель		Туя		Береза	
	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.
qP	0,667	0,889	1,7	2,8	0,252	0,118	0,241	0,125
qP_k-qP_z	-0,222		-1,1		0,134		0,116	

У липы и ели разница значений отрицательная, что связано с высокой чувствительностью к загрязнению, туя и береза в положительных значениях. В отличие от квантового выхода параметр фотохимического тушения у контроля меньше, чем в загрязненных районах, т.е. у контроля отток электронов меньше на фотосистему 1, чем у загрязненных образцов, связано это с тем, что контрольные растения несколько позже выходят из состояния покоя, чем растения, подверженные антропогенному стрессу. Дело в том, что растения в условиях стресса неглубоко впадают в покой. Поэтому внутренние резервы этих растений быстрее расходуются и общее состояние оценивается как ослабленное после выхода из покоя. Липа с елью в данном случае наиболее ослабленные деревья.

Параметр нефотохимического тушения выполняет двойную роль в защите клеток растений от неблагоприятных воздействий. Нефотохимическое тушение связано с защитой и предохранением хлорофилла от распада, так как происходит сбрасывание излишка энергии в виде излучения в виде тепла при переходе возбужденного электрона из синглетного состояния в основное. Хлорофилл не может бесконечно усваивать энергию света, наступает насыщение, все электроны уже «сидят» на своих переносчиках, и излишки электронов выбрасываются в виде тепла, происходит тепловая диссипация энергии [4—7]. При неблагоприятных условиях меньше энергии расходуется на фотосинтез, больше энергии выбрасывается в окружающее пространство в виде тепла, что предохраняет клетку от распада белков и отключения реакционных центров. Нефотохимическое тушение меняется при изменении температуры и интенсивности загрязнения. У всех видов растений разница между контролем и загрязненным уровнем достаточно четкая, нефотохимическое тушение возрастает (табл. 3).

Таблица 3

Значения нефотохимического тушения в различных условиях загрязнения

Вид	Липа		Ель		Туя		Береза	
	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.	Контр.	Загряз.
NPQ	0,11	0,925	0,74	2,25	0,7	2,5	0,12	0,52
NPQк-NPQз	-0,815		-1,51		-1,8		-0,4	

Наиболее чувствительный период в жизнедеятельности растений к загрязнению связан с концом периода покоя в марте—апреле, когда запасы сахаров у деревьев исчерпываются. В условиях повышенного загрязнения выхлопными газами от автомобильного транспорта деревья более ослабленные, чем вдали от дорог. У хвойных видов (туя, ель) большая разница в величине хлорофилла, чем у лиственных (липа, береза), вблизи дороги меньше значения F_0 . По квантовому выходу быстрой флуоресценции самая большая разница в значениях Fv/Fm обнаружена у липы и ели, по величине относительного параметра замедленной флуоресценции ОПЗФ эта разница значительнее, т.е. метод замедленной флуоресценции в данном случае более информативный. Единственно, у ели параметр квантового выхода сильно снижен в загрязненных местах именно в апреле, что связано с более низким

энергопотреблением и эффективностью фотосинтеза из-за подготовки к выходу из покоя. Тем не менее метод быстрой флуоресценции дает более полное представление о внутренних процессах внутри клеток: относительном электронном транспорте, оттоку электронов на фотосистему 1, тепловой диссипации избытка энергии света. По относительному электронному транспорту значения более высокие у хвойных, чем у лиственных, но у хвойных пород измерения проводились на иголках, а у лиственных на феллодерме ввиду невозможности проведения измерения на листьях в связи с сезонными факторами, поэтому у них и хлорофилла меньше. Значения разницы фотохимического тушения у ели и липы самые низкие, следовательно, эти виды более чувствительны к загрязнению. Значения нефотохимического тушения возрастают у всех деревьев в условиях повышенного загрязнения выхлопными газами. По значениям ОПЗФ, фотохимическому тушению, квантовому выходу переменной флуоресценции можно сделать вывод, что более чувствительными породами к загрязнению являются липа и ель. Однако по квантовому выходу в данном случае не всегда можно это увидеть достаточно четко. Иногда квантовый выход может у всех деревьев быть примерно одинаковым, а ОПЗФ сильно разнится при этом, т.е. по замедленной флуоресценции лучше видна разница между более и менее ослабленными видами, но по параметрам быстрой флуоресценции можно подробно увидеть, чем обусловлены эти изменения рядом с дорогой и вдали от дороги. Так как липа с елью более чувствительные породы, в целях озеленения их лучше высаживать вдали от дорог либо вторым рядом после кустарников, либо после берез и туй как более устойчивых пород к загрязнению.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Венедиктов П.С.* и др. Использование флуоресценции хлорофилла для контроля физиологического состояния зеленых насаждений в городских экосистемах // *Биофизика*. — 1999 — Вып. 6. — С. 1037—1047.
- [2] *Григорьев Ю.С.* Флуоресценция хлорофилла в биоиндикации загрязнения воздушной среды // *Вестник МАНЭБ*. — 2005. — Т. 10. — № 4. — С. 77—91.
- [3] *Маторин Д.Н.* и др. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла. — М.: Макспресс, 2010.
- [4] *Орехов Д.И.* и др. Флуоресцентный мониторинг древесных пород в различных условиях Москвы // *Актуальные проблемы современной науки*. — М.: Спутник+, 2011.
- [5] *Matorin D.N., Vuksanovich N., Rubin A.B., Venediktov P.S.* Application of chlorophyll fluorescence in studied of phytoplankton in the Mediterranean Sea // *StudiaMarina*. — 2002. — V. 23. — P. 79—86.
- [6] *Papageorgiou G.C., Govindjee.* Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Springer, 2004.
- [7] *Rascher U., Liebig M.&Luttge U.* Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field // *Plant, Cell and Environment*. — 2000. — № 23. — P. 1397—1405.

LITERATURA

- [1] *Venediktov P.S.* i dr. Ispol'zovanie fluorescencii xlorofilla dlya kontrolya fiziologicheskogo sostoyaniya zelenyx nasazhdenij v gorodskix e'kosistemax // *Biofizika*. — 1999. — Vyp. 6. — S. 1037—1047.

- [2] *Grigor'ev Yu.S.* Fluorescenciya xlorofilla v bioindikacii zagryazneniya vozduшной sredy // Vestnik MANE'B. — 2005. — Т. 10. — № 4. — С. 77—91.
- [3] *Matorin D.N.* i dr. Opredelenie sostoyaniya rastenij i vodoroslej po fluorescencii xlorofilla, — М.: Makspress, 2010.
- [4] *Orexov D.I.* i dr. Fluorescentnyj monitoring drevesnyx porod v razlichnyx usloviyax Moskvy // Aktual'nye problemy sovremennoj nauki. — М.: Sputnik+, 2011.
- [5] *Matorin D.N., Vuksanovich N., Rubin A.B., Venediktov P.S.* Application of chlorophyll fluorescence in studied of phytoplankton in the Mediterranean Sea // StudiaMarina. — 2002. — V. 23. — P. 79—86.
- [6] *Papageorgiou G.C., Govindjee.* Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Springer, 2004.
- [7] *Rascher U., Liebig M.&Luttge U.* Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field // Plant, Cell and Environment — 2000. — № 23. — P. 1397—1405.

SELECTION OF FLORESCENCE PHYTOINDICATOR OF INDUSTRIAL POLLUTION

D.I. Orehov, G.A. Kalabin

Peoples' Friendship University of Russia
Podolskoe shose, 8/5, Moscow, Russia, 113093

In the article are considered the study of fundamental changes in the parameters of fluorescence of the photosynthetic apparatus of trees (birch, lime-tree, thuja, fir), under the influence of pollution in the Moscow.

Key words: fluorescence, chlorophyll, relative quantum yield, photosynthesis, electron transport rate.