

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ЛИШАЙНИК *XANTHORIA PARIETINA* (L.) TH. FR.

СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ле Тхи Бич Нгуэт, С.Е.Журавлева, к.б.н.,
П.В.Бондаренко, к.б.н., Э.М.Трухан, д.ф.-м.н., МФТИ
solozhur@yandex.ru

УДК 543.429.22, 535.243.25;
БАК 02.00.02

Представлены результаты исследований влияния абиотических факторов среды на биоту на примере лишайника *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. В экспериментах использованы методы спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и оптической спектрометрии. Получены новые данные, отражающие динамику физиологического состояния организма при изменении влажности среды. Обсуждаются механизмы восстановления метаболизма лишайника при регидратации.

Спектроскопические методы служат важнейшим инструментом биофизических исследований биоты. Процессы метаболизма организмов зависят от экологических факторов среды, к которым также относятся абиотические: температура, влажность и т.д. Лишайники являются оптимальным объектом для изучения взаимодействия живого организма и окружающей среды, поскольку состоят из двух компонентов: фотобионта и микобионта. Метаболизм каждого имеет свои особенности, которые быстро проявляются при изменении экологических факторов из-за отсутствия систем защиты (покровных тканей) от внешнего воздействия.

В работе изучали спектроскопические характеристики лишайника *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. в условиях изменения влажности воздуха путем искусственного увлажнения. Методом ЭПР-спектроскопии получали сведения о строении металлопротеинов, а также об участии парамагнитных центров (ПМЦ) в процессах метаболизма, которые играют важную роль в формировании механизма реакции лишайника на изменение факторов внешней среды [1–3]. С помощью спектров поглощения определяли концентрацию пигментов.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И ОБОРУДОВАНИЕ

Талломы лишайника *X. parietina* были собраны в апреле 2015 года с коры форوفита *Populus nigra* (L.) в районе кампуса МФТИ (55°55'50" с. ш., 37°31'1" в. д.) по стандартной методике [4]. С помощью пинцета удаляли макро-

скопический инородный материал (мхи, частицы грунта и коры), после этого талломы лишайников промывали три раза по пять минут в дистиллированной воде, затем высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч.

При подготовке к регистрации спектров ЭПР после тонкого измельчения в фарфоровой ступке навеску образцов 50 мг засыпали в пластиковую пробирку диаметром 5 мм и толщиной стенки 0,1 мм.

Спектры ЭПР образцов лишайника снимали на ЭПР-спектрометре "СПЕКТР-001" (РФ), который был усовершенствован и сертифицирован (№ 910-13-01 от 9 июля 2013 года ВНИИФТРИ). Условия регистрации: частота 10 ГГц, уровень СВЧ-мощности не более 12 мВт, амплитуда модуляции индукции магнитного поля – не более 0,2 мТл, ширина развертки индукции магнитного поля – 3,2 или 51,2 мТл, постоянная времени накопления сигнала ЭПР – 1 или 2 с.

Пробирку с образцом лишайников помещали в центр резонатора спектрометра ЭПР. В качестве калибровочного образца использовали рубин, закрепленный в резонаторе прибора и ориентированный так, чтобы его спектр не накладывался на спектр исследуемых проб. Пластиковые пробирки предварительно проверяли на отсутствие в них фоновых сигналов ЭПР. Сигналы от образцов лишайника снимали в пятикратной повторности. Концентрацию парамагнитных центров определяли путем сравнения второго интеграла линий спектра ЭПР исследуемого образца и эталона с известной концентрацией

ПМЦ (2-2-дифенил-1-пикрил-гидразил ДФПГ) по формуле [3]:

$$N_x = N_{эт} \frac{(J'_0 \Delta H_{\max}^2)_x}{(J'_0 \Delta H_{\max}^2)_{эт}}$$

где: N_x и $N_{эт}$ – число ПМЦ в образце лишайника (x) и эталоне (эт); J'_0 – амплитуда сигнала спектра ЭПР; ΔH_{\max} – ширина спектра ЭПР на уровне максимальной кривизны линии поглощения.

Для исследования связи между парамагнитными свойствами и пигментами лишайника использовали спектрофлуориметр Solar CM 2203 (Республика Беларусь), который является одним из признанных инструментов изучения фотосинтетических и экранирующих пигментов [5, 6]. В нашем эксперименте был использован режим спектрофотометра: спектральный интервал 200–1100 нм, фотометрический диапазон –0,3...3 Б, погрешность фотометрирования менее 1%.

Подготовку проб для изучения содержания пигментов проводили согласно методике, предложенной в публикации [6]. После измельчения в фарфоровой ступке отбирали образцы навеской 25 мг в отдельные стеклянные флаконы объемом 10 мл, в каждый наливали по четыре миллилитра 95%-ного этанола. Флаконы плотно закрывали резиновыми крышками, взбалтывали, заворачивали в алюминиевую фольгу и помещали в холодильник (температура 5–10 °С), чтобы пигменты не разрушались под действием света и температуры. Через сутки снимали спектры поглощения полученных экстрактов из талломов лишайника в стандартных кварцевых кюветах толщиной 10 мм при комнатной температуре.

Оптическую плотность измеряли на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения: для хлорофилла а ($\lambda = 664$ нм), хлорофилла b ($\lambda = 648$ нм), каротиноидов ($\lambda = 470$ нм) и антрахинонов ($\lambda = 450$ нм). Содержание пигментов определяли с учетом оптической плотности экстрактного раствора, его объема и сухого веса образца лишайника. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Office Excel.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Процесс метаболизма лишайника зависит в значительной мере от влажности воздуха. Лишайники, как пойкилогидридные организмы, могут переносить длительное высыхание. По литературным данным, уменьшение содержания воды в талломах лишайников ниже 10% сопровождается снижением интенсивности жизненных процессов. Тем не менее, лишайник

Таблица 1. Изменение содержания воды в гербарных образцах лишайника *X. parietina*

Биомасса лишайника до сушки (m_1), мг	Биомасса лишайника после сушки (m_2), мг	$m_1 - m_2$, мг	$\frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100\%$
500	474	26	5,2
1176	1123	53	4,5
462	439	23	5,0
970	931	39	4,0
555	532	23	4,1

обладает устойчивостью к обезвоживанию и выживает в метаболически неактивном состоянии [7].

Проведен эксперимент по определению динамики потерь воды в хранимых гербарных образцах лишайника *X. parietina*. Их сушили при комнатной температуре в течение двух недель, затем сравнивали биомассы талломов лишайника до и после высушивания. Установлено, что после двух недель хранения в помещении содержание воды сократилось на 4,0–5,2% от общей биомассы лишайника (табл.1).

Недостаток воды в талломах лишайников вызывает как сморщивание клеток, так и деформирование клеточных органелл и мембранных систем клеток [8–10]. Устойчивость лишайников к обезвоживанию обусловлена тем, что в их клетках содержатся полиолы: рибит, арабит и манит, а также нередуцирующие сахара: трегалоза и сахароза. Эти соединения могут замещать воду, стабилизировать белки и мембраны клеток лишайника в сухих условиях [11], а при регидратации структуры клеток и процессы метаболизма восстанавливаются [7, 12, 13].

Для оценки восстановления этих процессов проведено исследование пигментов фотосинтетического аппарата фотобионта и экранирующих пигментов микобионта лишайника. Фотосинтез служит источником углеводов и поэтому играет ключевую роль в регуляции процессов жизнедеятельности лишайника [14]. В эксперименте использовали гербарные образцы *X. parietina*, которые после сбора 11 мес. хранили в помещении в закрытых бумажных конвертах при постоянной влажности и комнатной температуре. Восстановление процессов метаболизма проводили путем регидратации в течение семи недель: каждые 24 ч образцы лишайника увлажняли дистиллирован-

Таблица 2. Биофизические характеристики *X. parietina*, полученные спектрометрическими методами при регидратации в течение семи недель

Неделя	Содержание пигментов				ПМЦ	
	Хл (а+b), мкг/мг	Хл а/б	Каротиноиды, мкг/мг	Антрахиноны, мкг/мг	$N_1^* \times 10^{12}$, спин/мг	$N_2^{**} \times 10^{17}$, спин/мг
0	1,26 ± 0,14	3,34	0,12 ± 0,07	10,55 ± 1,69	3,1 ± 0,9	3,1 ± 0,4
1	0,99 ± 0,09	2,29	0,15 ± 0,02	9,83 ± 0,85	3,3 ± 0,4	5,0 ± 0,7
2	1,18 ± 0,10	2,01	0,13 ± 0,03	11,19 ± 0,94	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,1
3	1,45 ± 0,08	1,87	0,16 ± 0,07	15,02 ± 2,05	3,6 ± 0,3	8,4 ± 0,8
4	2,10 ± 0,11	1,86	0,29 ± 0,03	10,55 ± 0,97	3,6 ± 0,3	8,2 ± 0,6
5	1,10 ± 0,07	1,67	0,15 ± 0,04	9,42 ± 1,15	4,1 ± 0,5	14,1 ± 2,3
6	0,95 ± 0,07	2,03	0,10 ± 0,01	8,12 ± 1,32	3,5 ± 0,7	8,0 ± 0,8
7	1,56 ± 0,03	2,29	0,12 ± 0,02	10,53 ± 0,69	3,7 ± 0,8	5,6 ± 0,5

* N_1 – концентрация ПМЦ узкого сигнала ЭПР-спектра лишайника.

** N_2 – концентрация ПМЦ широкого сигнала ЭПР-спектра лишайника.

ной водой объемом 50 мл с помощью ручного опрыскивателя в условиях чередования светового и темного режима (цикл день-ночь). Во время эксперимента средние температура и относительная влажность воздуха составляли (26 ± 2) °С и (30 ± 6) % соответственно.

Образцы отбирали для исследований в конце каждой недели в течение всего периода регидратации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хлорофилл а входит в состав реакционных центров фотосистемы I и II и светособирающих комплексов (ССК). Хлорофилл b содержится исключительно в ССК, которые выполняют функцию первичного поглощения квантов света с последующей передачей энергии возбуждения на реакционные центры фотосистемы I и II. Получив поглощенную ССК энергию, хлорофилл переходит в возбужденное состояние, запуская начало цепочки химических реакций фотосинтеза [15]. Соотношение хлорофиллов а и b (Хл а/б) – одна из характеристик для оценки доли хлорофиллов в ССК фотосинтетического аппарата [6, 15].

Установлено, что сумма содержания хлорофиллов а и b в фотобионте сначала увеличивается от (1,26 ± 0,14) мкг/мг до (2,10 ± 0,11) мкг/мг, достигнув максимума к концу четвертой недели. Это объясняется самой высокой скоростью деления клеток фотобионта в этот период [16]. Соотношение Хл а/б уменьшается

в два раза к концу пятой недели, а затем увеличивается до исходного значения (табл.2).

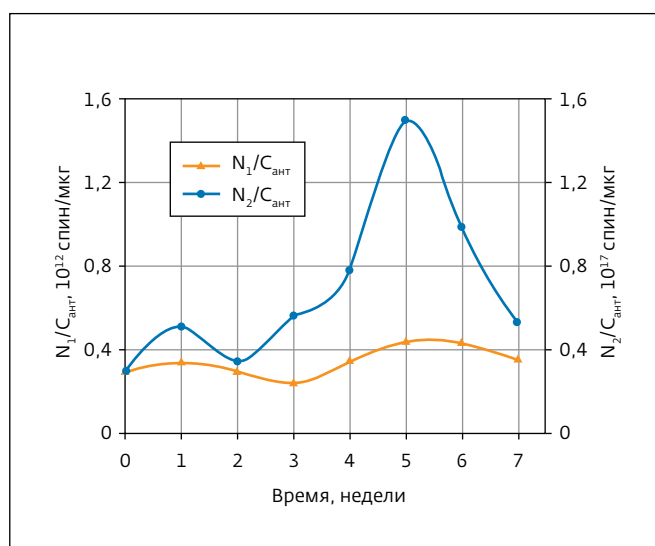
Отметим, что большой разброс значений стандартных отклонений измеренных величин связан с неоднородностью микроусловий места обитания (наклон ствола, экспозиция таллома лишайника, возраст таллома и т.д.). Для исследования невозможно собрать абсолютно идентичные образцы, поскольку каждый экземпляр представляет собой неповторимый живой объект. Мы только можем стандартизировать места и время сбора образцов по определенной известной методике [4].

Уменьшение соотношения Хл а/б указывает на рост содержания хлорофиллов в ССК и, соответственно, увеличение размеров ССК, что способствует более эффективному использованию световой энергии в фотохимических реакциях. В результате возрастает интенсивность связанного с окислительно-восстановительными реакциями фотосинтеза [6], стимулируя формирование парамагнитных центров в лишайнике [15]. В пользу этого свидетельствуют полученные результаты: концентрация ПМЦ в образцах лишайника равномерно увеличивается и достигает максимального значения к концу пятой недели. При этом, максимальная концентрация ПМЦ узкого сигнала ЭПР (N_1) в 1,3 раза, а ПМЦ широкого сигнала ЭПР (N_2) – в 4,5 раза больше их начальных значений (см. табл.2).

Каротиноиды в фотосинтетическом аппарате выполняют функции дополнительных светособирающих пигментов и защищают хлорофиллы от фотодеструкции [15]. Содержание каротиноидов меняется в интервале от $(0,10 \pm 0,01)$ до $(0,29 \pm 0,03)$ мкг/мг за весь период эксперимента, достигнув максимального значения к концу четвертой недели.

В лишайнике происходит биосинтез экранирующих пигментов (антрахинонов), защищающих фотобионт от разрушения. Они осаждаются в виде экстрацеллюлярных кристаллов в верхнем коровом слое и в межклеточном пространстве лишайника [5]. По результатам эксперимента установлено, что содержание антрахинонов увеличивается в 1,4 раза к концу третьей недели, а затем уменьшается до исходной величины. Отметим, что максимальная концентрация антрахинонов в 52 раза выше, чем каротиноидов. Мы можем предположить, что увеличение интенсивности фотосинтеза происходит только после того, как завершится активный синтез антрахинонов (см. табл.2).

По литературным данным природа узкого сигнала ЭПР определяется малоактивными долгоживущими радикалами семихинонного типа [1], которые формируются в результате реакции одноэлектронного восстановления антрахинонов, играющих роль антиокси-



Зависимость отношения концентраций ПМЦ (N_1 и N_2) и антрахинонов от времени

дантов [1, 2, 17]. Отношение концентраций ПМЦ узкого сигнала и антрахинонов ($N_1/C_{ант}$) незначительно изменяется за весь период эксперимента, что подтверждает природу и механизм образования ПМЦ этого сигнала (см. рисунок). Это означает, что концентрация

ПМЦ узкого сигнала отражает динамику содержания антрахинонов.

Природа широкого сигнала ЭПР определяется ионами парамагнитных металлов железа, марганца, меди и их комплексами [1]. Известно, что железо в воздухе находится в форме сульфата железа (II), оксида и хлорида железа (III), медь – в форме хлорида меди (I), хлорида, оксида, сульфита и сульфата меди (II), а марганец – в форме сульфата марганца (II) и оксида марганца (IV). Восстановление процессов метаболизма лишайника при регидратации требует активации поглощения и накопления химических элементов, необходимых для обеспечения физиологических функций организма. Лишайники по своим физиологическим особенностям способны поглощать соединения данных металлов из атмосферного воздуха, что объясняет увеличение концентрации ПМЦ широкого сигнала. Кроме того, установлено, что отношение концентраций ПМЦ широкого сигнала и антрахинонов ($N_2/C_{ант}$) увеличивается в пять раз к концу пятой недели эксперимента (см. рисунок). Это показывает, что уменьшение содержания антрахинонов, играющих роль антиоксидантов, на этой стадии может приводить к окислительно-восстановительному дисбалансу. В цепи окислительно-восстановительных процессов происходит образование ионов металлов в парамагнитном состоянии, поэтому растет концентрация парамагнитных центров широкого сигнала в образцах лишайника.

Таким образом, в результате использования ЭПР-спектрометра и спектрофотометра были получены новые экспериментальные данные по биофизическим механизмам реакции лишайника *X. parietina* на смену экологических факторов среды. Установлено, что внутриклеточные процессы жизнедеятельности лишайника зависят от концентрации ПМЦ, а также содержания как фотосинтетических пигментов фотобионта, так и экранирующих пигментов микобионта.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Jeziarski A., Bylinska E., Seaward M.R.D.** Electron paramagnetic resonance (EPR) investigations of lichens—I: effects of air pollution // *Atmospheric Environment*. 1999. Т. 33. № 28. P. 4629–4635.
2. **Журавлева С.Е., Бондаренко П.В., Трухан Э.М.** Биомониторинг индикаторных видов лишайников методом ЭПР-спектроскопии // *Биофизика*. 2013. Т. 58. №2. С. 329–333.
3. Патент РФ № 2549471. Способ определения качества окружающей среды методом ЭПР-спектроскопии лишайников / **Журавлева С.Е., Бондаренко П.В.**; опубл. 27.04.2015.
4. **Солдатенкова Ю.П.** Малый практикум по ботанике. Лишайники (кустистые и листоватые). – М., 1977. 123 с.
5. **Solhaug K.A., Gauslaa Y.** Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina* // *Oecologia*. 1996. Т. 108. № 3. P. 412–418.
6. **Lichtenthaler H.K., Buschmann C.** Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy // *Current protocols in food analytical chemistry*. 2001. F4.3.1-F4.3.8.
7. **Honegger R.** The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp // *Plant Biology*. 2003. Т. 5. № 3. P. 324–330.
8. **Honegger R.** Experimental studies with foliose macrolichens: fungal responses to spatial disturbance at the organismic level and to spatial problems at the cellular level during drought stress events // *Canadian Journal of Botany*. 1995. Т. 73. № S1. P. 569–578.
9. **Honegger R.** The lichen symbiosis – what is so spectacular about it? // *The Lichenologist*. 1998. Т. 30. № 3. P. 193–212.
10. **Honegger R.** *Micobionts* // *Lichen Biology 2nd edition* / ed. Nash T.H. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. P. 27–39.
11. **Beckett R.P., Kranner I., Minibayeva F.V.** Stress physiology and the symbiosis // *Lichen Biology 2nd edition* / ed. Nash T.H. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. P. 136–153.
12. **Alpert P.** The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants // *Plant Ecology*. 2000. Т. 151. №1. P. 5–17.
13. **Хебер У., Ланге О.Л., Шувалов В.А.** Запасание и диссипация энергии света растениями как взаимно дополняющие процессы, вовлеченные в поддержание жизни растения // *Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты* / Под ред. Рубина А.Б. // М., 2007. С. 195–222.
14. **Friedl T., Büdel B.** *Photobionts* // *Lichen Biology 2nd edition*, ed. by Nash T.H. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. P. 9–26.
15. **Холл Д., Рао К.** Фотосинтез / Под ред. Литвина Ф.Ф.; пер. с англ. Ганаго А.О. // М.: Мир, 1983. 134 с.
16. **Gasulla V.F.** Insights on desiccation tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia* sp. pl. in both thalline and isolated ones: diss. PhD Thesis. Valencia, 2009. 208 pp.
17. **Рогинский В.А.** Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность // М.: Наука, 1988. 247 с.