

КОМП'ЮТЕРНІ ЗАСОБИ, МЕРЕЖІ ТА СИСТЕМИ

G. Antonova, O. Kovyrova

ELEMENTS OF METHODOICAL SUPPORT FOR TESTING BIOSENSOR PROTOTYPES ON THE TEST PLANTS UNDER INFLUENCE OF STRESS FACTORS

The paper describes the elements of methodical support for biosensor prototypes on the test plants under influence of stress factors.

Key words: chlorophyll fluorescence induction, biosensor, photosynthesis, methodical support.

В работе рассмотрены результаты разработки элементов методики испытаний опытных образцов биосенсора на тестовых культурах под влиянием стрессовых факторов.

Ключевые слова: индукция флуоресценции хлорофилла, биосенсор, фотосинтез, методика испытаний.

В роботі розглянуті результати розробки елементів методики випробувань дослідних зразків біосенсора на тестових культурах під впливом стресових факторів.

Ключові слова: індукція флуоресценції хлорофілу, біосенсор, фотосинтез, методика випробувань.

© Г.В. Антонова, О.В. Ковирьова,
2016

УДК 578.01+681.7.08+535.3+681.335.2

Г.В. АНТОНОВА, О.В. КОВИРЬОВА

ЕЛЕМЕНТИ МЕТОДИКИ ВИПРОБУВАНЬ ДОСЛІДНИХ ЗРАЗКІВ БІОСЕНСОРА НА ТЕСТОВИХ КУЛЬТУРАХ ПІД ВПЛИВОМ ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

Вступ. Відповідно до Закону України "Про охорону навколишнього природного середовища" "Охорона навколишнього природного середовища, раціональне використання природних ресурсів, забезпечення екологічної безпеки життєдіяльності людини – невід'ємна умова сталого економічного та соціального розвитку України". Отже, на сьогодні оцінювання стану екології як в межах держави, так і на окремих територіях є досить важливим завданням. Чим скоріше ми отримаємо інформацію про погіршення екологічного стану на певній території, тим швидше можемо вжити певні міри для запобігання погіршення екологічної ситуації, а в деяких випадках передбачити та уникнути техногенних катастроф.

Погіршення екологічних умов може зумовлюватися багатьма причинами, серед яких не останнє місце займають викиди шкідливих речовин. У Постанові Кабінету Міністрів України № 343 від 09.03.1999 визначено список забруднюючих речовин, моніторинг яких проводиться на регіональному (локальному) рівні, серед яких такі важкі метали, як залізо, кадмій, марганець, хром, мідь, цинк, миш'як та їх сполуки. Одним із методів моніторингу викидів шкідливих речовин є висадження рослин-індикаторів у потенційних районах забруднень. Оцінити їх стан можна кількома способами, зокрема візуальним, мікробіологічним, за допомогою використання методу індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) тощо. Метод ІФХ дозволяє визначити загаль-

ний стан рослини в експресному режимі за допомогою оцінки основного процесу життєдіяльності рослини – фотосинтезу. Фотосинтетичні процеси є процесами, які забезпечують клітини рослини енергією. Хлорофіл є одним з основних пігментів клітин рослини. Однією з характеристик молекули хлорофілу є здатність флуоресцювати. Інтенсивність флуоресценції хлорофілу залежить від фотосинтетичної активності рослини. Після освітлення листа рослини інтенсивність флуоресценції хлорофілу спочатку швидко зростає, а потім повільно зменшується. Цей ефект називається ефектом Каутського або ефектом індукції флуоресценції хлорофілу.

На світовому ринку існує велика кількість портативних приладів для вимірювання ІФХ [1]. В Інституті кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України створено і поставлено на серійне виробництво портативний прилад сімейства "Флоратест" (спектральний діапазон вимірювання інтенсивності флуоресценції від 670 до 770 нм), а також розроблені бездротові біосенсори [2], які дають змогу одночасно вимірювати ІФХ в лісопарках, заповідниках, на великих площах сільськогосподарських угідь тощо. Для їх використання необхідно розробити методіку випробувань на тестових культурах під впливом дії стресових факторів, з цією метою в Інституті проведено серію натурних експериментів. Використання даного методу вимагає розуміння процесів, які проходять в листях живих рослин.

Флуоресценція хлорофілу та процеси перетворення енергії в хлоропластах вищих рослин. Характер зміни первинних стадій фотосинтезу безпосередньо відбивається в зміні флуоресценції хлорофілу у фотосинтетичних мембранах клітин [3]. Поглинання кванта світла переводить молекулу хлорофілу в електронний збуджений стан, енергія якого при відсутності фотосинтезу переходить або в тепло, або в флуоресценцію. Енергія електронного збудження хлорофілу у фотосинтетичній мембрані використовується в реакційних центрах (РЦ) для генерації потоку електронів у первинних стадіях фотосинтезу, необхідних для відновлення НАДФ¹ і утворення АТФ². Первинні процеси фотосинтезу вищих рослин здійснюються за участю двох фотосистем, що функціонують послідовно. Фотосистема два (ФС II) розщеплює воду з виділенням вільного кисню і віддає електрон через ланцюг переносників на фотосистему один (ФС I), яка відновлює НАДФ. У клітині, в основному, флуоресцює хлорофіл, що належить ФС II, і саме зміни цієї флуоресценції обумовлюють стан реакційних центрів ФС II. У процесі фотосинтезу, коли всі РЦ знаходяться у відкритому робочому стані, при слабкому освітленні використовується майже вся поглинута енергія світла. Невелика частина енергії електронного збудження переходить в енергію світла

¹ НАДФ (NADP, Никотинамидадениндинуклеотидфосфат) – кофермент деяких дегідрогеназ – ферментів, які каталізують окисно-відновні реакції у живих клітинах. В хлоропластах рослин НАДФ відновлюється в світлових реакціях фотосинтезу і далі забезпечує киснем синтез вуглеводів у темній фазі фотосинтезу.

² АТФ (АТР, адезинтрифосфат) – нуклеотид, що складається з аденіну, цукру рибози і трьох фосфатних груп. Основне джерело хімічної енергії в обміні речовин.

флуоресценції у вигляді фонові флуоресценції F_0 . В нормальних умовах величина F_0 мала, що говорить про активне використання клітинами енергії поглинутого світла. Проте, якщо при наявності будь-якого впливу порушується стан фотосинтетичних мембран, то РЦ переходять в неактивний (закритий) стан, тобто такий стан, коли відбувається припинення потоку електронів у первинних процесах фотосинтезу. В цих умовах поглинута енергія світла вже не може використовуватися у фотосинтезі й тому флуоресценція хлорофілу зростає. В процесі флуоресціювання абсолютна величина та квантовий вихід досягають максимальних значень (F_m) (рис. 1).

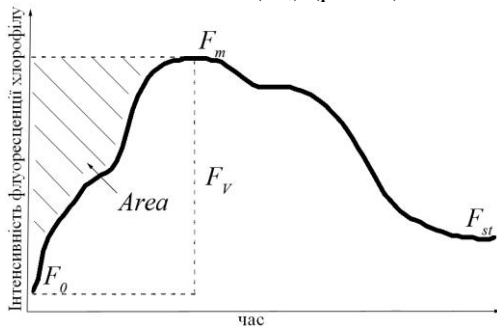


РИС. 1. Типова крива індукції флуоресценції хлорофілу

В 1961 р. Дьюсен та співавтори встановили, що зростання флуоресценції від F_0 до F_m обумовлене відновленням первинного хінонного акцептора Q_A . Різницю між інтенсивністю флуоресценції хлорофілу при закритих і відкритих РЦ називають змінною або «варіабельною» флуоресценцією хлорофілу в клітинах ($F_v = F_m - F_0$). Величина F_v відповідає частині енергії світла, яка використовується відкритими РЦ у фотосинтезі, тобто характеризує активність початкових стадій фотосинтезу.

Крім того, для аналізу використовуються наступні параметри та відношення: відношення F_v/F_0 показником фотохімічної активності ФС II; F_{st} – стаціонарний рівень флуоресценції; F_m/F_{st} – розрахунковий параметр, який характеризує ефективність темної стадії фотосинтезу та ефективність поглинання вуглекислого газу; $K_i = (F_m - F_{st})/F_m$ – параметр ІФХ, який зменшується під дією стресових чинників; F_v/F_m – параметр, який характеризує ефективності фотохімічних реакцій та залежить від кількості активних комплексів ФС II в рослині; $R_{fd} = (F_m - F_{st})/F_{st}$ – індекс життєдіяльності рослини; параметр *Area* пропорційний розміру пулу акцепторів електронів Q_A на відновній стороні ФС II і може бути використаний як маркер змін у формі кінетики ІФХ між F_0 і F_m .

Аналіз параметрів флуоресценції хлорофілу є потужним та ефективним інструментом вивчення дії різноманітних екологічних чинників на рослинні організми. Хімічні чинники і кліматичні умови, які часто є інгібіторами та активаторами біоенергетичних процесів, що протікають у тилакоїдах рослинних клітин, впливають на параметри кінетики і спектральні особливості флуоресценції, а також на її стаціонарний рівень.

Вибір тестових культур та впливового чинника. Дослідну рослину необхідно вибирати виходячи з впливового чинника та його концентрацій, які необхідно зареєструвати флуоресцентним методом. Види рослин, які використовуються в дослідженнях, мають відповідати наступним вимогам: бути характерними для природної зони, де розташовується даний об'єкт; рослини-індикатори

мають бути розташовані на всій території; повинні мати чітко виражену кількісну і якісну реакцію на відхилення властивостей середовища життя від екологічної норми; біологія даних видів-індикаторів має бути добре вивчена.

При проведенні досліджень крім вищезгаданих критеріїв при виборі рослин-індикатора слід дотримуватися додаткових рекомендацій: вивчати рослини одного віку, відбирати середню пробу з декількох екземплярів рослин (8–10 екземплярів), проводити відбір з однієї висоти і по всьому колу крони дерев.

Рослинами індикаторами можуть служити наступні рослини: деревні породи – сосна звичайна, ялина, береза, липа, дуб, тополя; види трав'янисто-чагарникового ярусу – брусниця, чорниця, багно; види чагарникового ярусу – верба, шипшина, карликова береза; види трав'янистих рослин складноцвітові розові, губоцвіті, шавлія степова, вероніка сива, полин звичайний, тютюн, красоля, кульбаба лікарська, соняшник звичайний, шпинат, горох, квасоля, соя, лобода.

Реакція рослин на надлишковий вміст елементів у ґрунті, яка спостерігається візуально, відрізняється для кожного елемента. Зокрема, ознакою надлишкового вмісту цинку в ґрунті є знебарвлення і відмирання тканин листа, пожовтіння молодого листа, відмирання бруньок, забарвлювання жилок в червоний або чорний колір, перші ознаки з'являються на молодих рослинах; міді – хлороз молодого листа, при цьому жилки залишаються зеленими, гальмується розвиток, на листях з'являються бурі плями і листи відмирають; марганцю – поява хлорозу між жилками, некроз тканин, молоді листи викривляються та зморщуються; заліза – на молодому листі з'являється хлороз між жилками, які залишаються зеленими, пізніше лист стає білуватим або жовтим; кобальту – вздовж основних жилок листа з'являються заповнені водою прозорі ділянки; відбувається некроз тканини, пізніше листя набуває коричневе забарвлення та опадає.

Для дослідження впливу важких металів на рослини елементи вносяться у вигляді солей, доза внесення відповідає граничнодопустимим концентраціям (ГДК) [4], наприклад, 5, 10, 20 ГДК.

Дослідження зміни індукції флуоресценції хлорофілу під впливом важкого металу. Для напрацювання методичного забезпечення інтелектуальних біосенсорів проведено два експерименти з дослідження впливу важких металів на рослини. Як впливовий чинник обрано мідь, яка вносилася у формі мідного купоросу ($CuSO_4$). Мідь – поширений антропогенний полютант, оскільки металева мідь є одним з найбільш розповсюджених конструкційних металів. З іншого боку, мідь – важливий мікроелемент, іони якого беруть участь у перенесенні електронів в електрон транспортному ланцюгу мітохондрій і хлоропластів, синтезі пігментів і активації багатьох ферментів. При надлишку міді знижується рівень біосинтезу хлорофілу, змінюється білковий склад хлоропластів, інгібується транспорт електронів по фотосинтетичному ланцюгу. Вимірювання проводились за допомогою біосенсора. Під час експериментів фіксувалися параметри оточуючого середовища, а саме: температура повітря та ґрунту, вологість повітря та ґрунту тощо. Кожний дослід проводився мінімум 10 днів.

Для першого експерименту об'єктом дослідження обрано рослину лободу. Вона має широкий ареал, росте в різних екологічних умовах. У ході експериме-

нту досліджено вплив на флуоресценцію хлорофілу дослідних рослин різних доз токсиканту. Для проведення експерименту рослини поділено на 4 групи з різними дозами внесення $CuSO_4$, який розчинено у воді та внесено у ґрунт. Група V1 – контрольна група без внесення $CuSO_4$; група V2 – 1 г $CuSO_4$ /1 кг ґрунту; група V3 – 3 г $CuSO_4$ /1 кг ґрунту; група V4 – 6 г $CuSO_4$ /1 кг ґрунту. На початку експерименту заміряно ІФХ всіх груп рослин (рис. 2, а). В той же день було внесено розчин мідного купоросу в ґрунт.

В другому експерименті проведено дослідження зміни індукції флуоресценції хлорофілу під впливом важкого металу (сульфату міді $CuSO_4$) та відсутністю поливу. Дослідження виконано за схемою повного двофакторного експерименту. Об'єктом дослідження обрано рослину Соя (лат. *Glycine max*), які вирощені в кімнатних умовах з насіння. Рослини поділено на чотири групи: група W1 – без впливу важкого металу, без поливу; група W2 (контрольна) – без $CuSO_4$, з поливом; група W3 – з впливом $CuSO_4$, без поливу; група W4 – з впливом $CuSO_4$, з поливом. Доза $CuSO_4$ становила 6 г на 1 кг ґрунту для рослин в групах W3 та W4. Сульфат міді внесено в землю після першої серії вимірювання кривих ІФХ (рис. 2, б). З наступного дня припинено полив в групах W1 та W3.

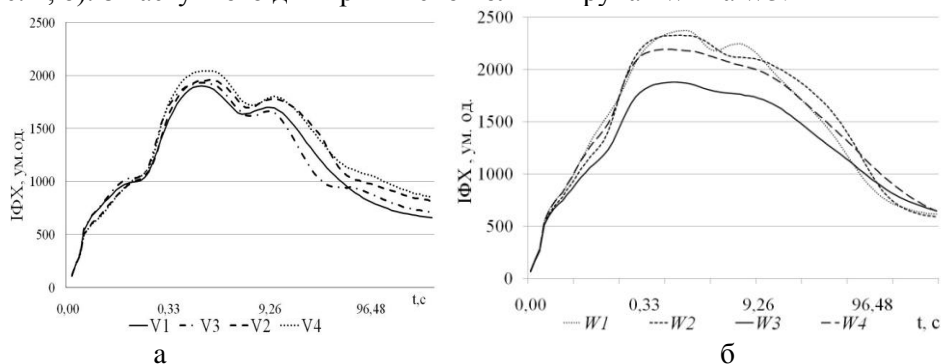


РИС. 2. Криві ІФХ тестових рослин до внесення в ґрунт мідного купоросу всіх груп рослин: а – лобода, б – соя

Аналіз отриманих кривих проводився наступним чином: в комп'ютер внесені параметри оточуючого середовища та розраховані середні значення; збережені криві ІФХ об'єднані в групи; виконана перевірка кривих щодо виникнення технічних помилок; криві розділені на групи відповідно до схеми експерименту; розраховані середні значення кривих у кожній групі для кожного дня експерименту; побудовані графіки ІФХ за групами. Далі в усіх групах розраховані значення параметрів ІФХ F_0 , F_{st} , F_m , F_v , F_v/F_m , K_i , R_{fd} , $Area$, побудовані графіки значень параметрів по дням та проаналізовані.

Вже на другий день після внесення у ґрунт мідного купоросу ІФХ знизилась в усіх дослідних групах рослин лобода. На третій день значно знижується стаціонарний F_{st} та максимальний F_m рівні флуоресценції хлорофілу у рослин, які були оброблені токсикантом. Зазначимо, що на шостий день впливу токсиканту

залишилась тільки одна дослідна група рослин – V2, а дві інші дослідні групи рослин загинули. Підвищення значення F_0 (рис. 4, а) є результатом дії будь-якого несприятливого фактору. У всіх дослідних групах рослин на другий день експерименту відмічено зростання рівня F_0 на 26 %, 27 % та 33 % відповідно, що свідчить про негативну дію мідного купоросу на фотосинтетичну активність рослин. Зростання параметра F_0 спостерігається протягом експерименту до 10.08, а після поступово знижується. У групі V2 показник в останній день експерименту знизився на 17 %.

Варіабельна флуоресценція F_v (рис. 4, б) визначається окислювально-відновним статусом Q_A , її рівень є індикатором фотохімічних окислювально-відновних процесів. Коли транспорт електронів блоковано від Q_A до наступних компонентів електрон-транспортного ланцюгу (ЕТЛ), F_v швидко досягає максимально можливих значень. Отже, зовнішні умови, які впливають на процес електронного транспорту в ЕТЛ тилакоїдів, впливатимуть на величину F_v . Це дозволяє використати F_v як показник, який відображає вплив екологічних факторів на рослини.

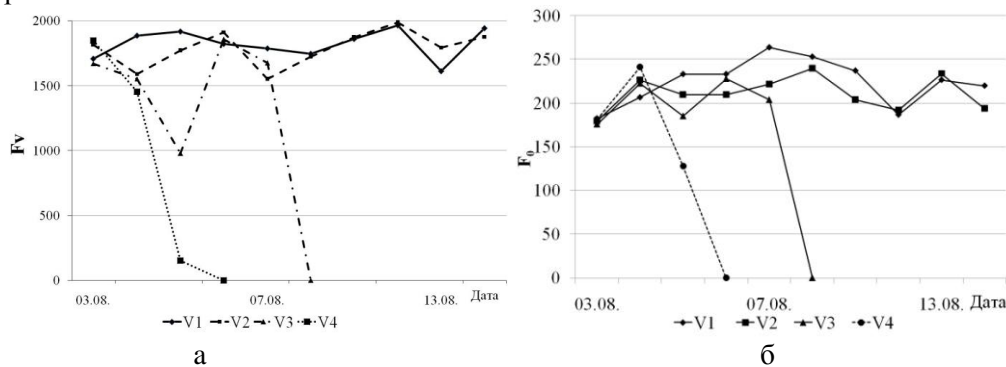


РИС. 4. Значення параметра: а – F_v та б – F_0 в контрольній групі та в усіх дослідних групах

Відзначимо, що на другий день після внесення у ґрунт токсиканту рівень F_v знизився в усіх дослідних групах рослин. На третій день впливу мідного купоросу у дослідних групах V3, V4 відбулося різке падіння значень F_v , яке складає 41 % та 92 % відповідно. Наступного дня всі рослини у групі V4 загинули. У дослідній групі V2 на другий день також спостерігалось падіння значень показника F_v на 13 %, але протягом експерименту рівень F_v відновився до початкових значень, що може свідчити про пристосування рослин до впливу мідного купоросу. На основі аналізу змін F_v можна зробити висновок про те, що важкі метали інгібують фотосинтетичну активність рослин. Існує кореляція між впливом важкого металу мідного купоросу та величиною відносної змінної флуоресценції.

Аналіз відношення F_v/F_m дозволяє отримати інформацію про фотохімічні реакції, які є найбільш чутливими до факторів оточуючого середовища. Для рослин у нормальному стані показник знаходиться в діапазоні 0,8–0,892. Максимальна різниця між значеннями показників F_v/F_m , які отримані в контрольній та

дослідній групі рослин V4 (рослини з даної групи отримали максимальну дозу мідного купоросу), становила 39 %. На початку дослідження цей показник мав майже однакові значення в чотирьох групах V1, V2, V3, V4 – 0,907 в середньому.

За допомогою аналізу параметрів F_{st} та F_m було оцінено критичні дози мідного купоросу при його впливі на рослину. Критичною дозою токсиканту вважається така доза, що призводить до незворотних змін стану фотосинтезу рослини. Визначимо та кількісно оцінимо критичну дозу впливу токсиканту на рослини за допомогою співвідношення $F_{st} > 0,5 \times F_m$. Якщо виконується співвідношення $F_{st} > 0,5 \times F_m$, то доза впливу вважається критичною і вимірювання припиняють. В нашому випадку під цей критерій підпадає доза дії у 6 г, яка впливає на рослини групи V4, де $F_{st} = 264$, а $0,5 \times F_m = 142$. Таким чином, доза у 6 г мідного купоросу була критичною для рослин лободи у групі V4. Різні дози мідного купоросу по-різному вплинули на фотосинтетичний апарат рослин. Аналіз результатів впливу токсиканту показав, що доза в 3 г є критичною для рослин групи V3, що викликає незворотні зміни. Фотосинтетичний апарат рослин, оброблених дозою в 3 г, перестає функціонувати на 8 день впливу токсиканту. Доза в 6 г вже на третій день порушує фотосинтетичні процеси в рослині. Але зазначимо, що доза в 1 г, не тільки не призвела до зовнішніх змін рослини, але і не порушила фотосинтез рослини.

Важливими вимогами до процесу вимірювання флуоресценції хлорофілу є регулярність та підтримка однакових умов вимірювання. Дослідження над рослиною соя проводилися в лабораторних умовах. Перед вимірюваннями рослини переносилися в тінь. Лабораторія охолоджувалася протягом однакового часу. Однак під час вимірювання двічі виникала ситуація, коли вимірювання починалися раніше, ніж в інші дні.

Відповідно температури повітря та ґрунту були вищими. В результаті значення параметра F_v/F_m в контрольній групі (W2) в ці два дні значно знизилася в порівнянні з іншими днями. На рис. 5 чітко спостерігається кореляція між температурами ґрунту та повітря і значеннями параметра F_v/F_m , що слід врахувати

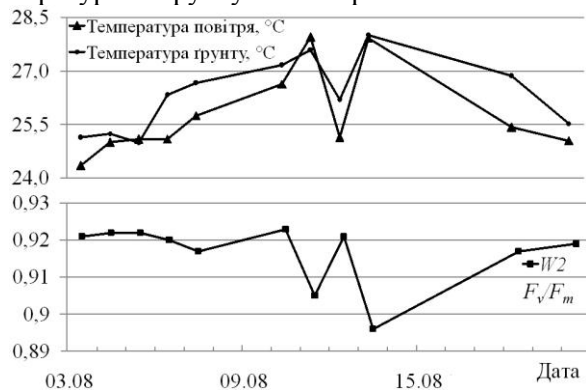


РИС. 5. Температури повітря і ґрунту та значення параметра F_v/F_m в контрольній групі (W2)

при розробці та застосуванні методичного забезпечення. Отже, підвищення температури впливає на значення параметра F_v/F_m . Відповідно, під час проведення експерименту слід уникати різких перепадів температури, які впливають на результати вимірювань.

На шостий день експерименту проведено останнє вимірювання в групі W3, оскільки всі рослини засохли, за винятком двох пожовтілих листів. Надалі вимірю-

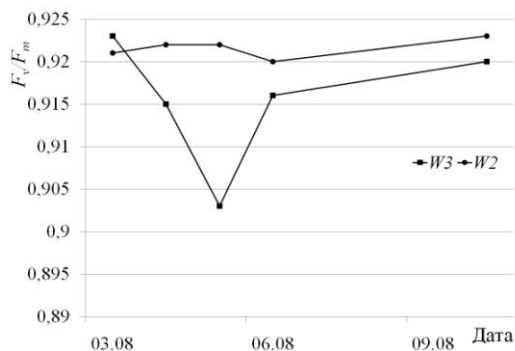


РИС. 6. Значення параметра F_v/F_m в контрольній групі (W2) та дослідній групі (W3)

вання в цій групі не проводилося. На рис. 6 показані значення параметра F_v/F_m в групах W3 (без поливу, з впливом важкого металу) та W2 (контрольна). На другий день дослідження значення параметрів у групі W3 падає, що свідчить про вплив важкого металу на рослину. На четвертий день значення підвищилися, що свідчить про пристосування фотосинтетичного апарату рослини до впливу важкого металу.

Отже, значення параметра F_v/F_m знижується при підвищенні температури оточуючого середовища. Тому, під час вимірювання слід уникати різких перепадів температури, оскільки це впливає на результати досліджень. При аналізі результатів експериментів не можна обмежуватися лише аналізом параметрів флуоресценції хлорофілу, а слід враховувати форму кривих ІФХ.

Висновки.

1. Розглянуто результати розробки елементів методики випробувань дослідних зразків біосенсору на тестових культурах під впливом дії стресових факторів, зокрема вибір рослин та впливового чинника для досліджень.

2. Розглянуто процеси перетворення енергії у хлоропластах вищих рослин, що надалі дозволить правильно аналізувати параметри кінетики флуоресценції хлорофілу даних, отриманих у результаті проведених експериментів.

3. Експериментально доведено, що параметри кінетики флуоресценції хлорофілу мають велику інформативність для оцінки стану первинних процесів фотосинтезу рослин у реальному часі.

Робота виконана при підтримці Науково-технологічного центру в Україні, проект № 6064.

1. <http://www.dasd.com.ua/>
2. Kryvonos Yu., Romanov V., Wojcik W., Galelyuka I., Voronenko A. Application of wireless technologies in agriculture, ecological monitoring and defense. *The 8th IEEE International conference on "Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems"*, IDAACS'2015. Warsaw, Poland. 2015, September 24–26.
3. Rubin A.B. *Sorosovskiy obrazovatelniy zhurnal*. 2000. Vol. 2. P. 7–13.
4. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії: Моногр. / Ж.З. Гуральчук; Ін-т фізіології рослин і генетики НАН України. К.: Логос, 2006. 208 с.

Одержано 30.09.2016