

УДК 577.4:535.37:538.56

О. О. Григор'єва, О. В. Вакуленко, О. І. Даценко,  
М. А. Березовська

### ЛЮМИНЕСЦЕНТНИЙ КОНТРОЛЬ ВПЛИВУ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЗЕЛЕНІ ВОДОРСТІ

Досліджено спектри фотолюмінесценції та динаміку чисельності клітин різних видів зелених водоростей після опромінення мікрохвильовою радіацією дециметрового діапазону. Показано, що залежно від дози опромінення змінюється як спектр та інтенсивність фотолюмінесценції, так і кількість клітин у культурі, причому ці показники не завжди корелюють між собою. Виявлено як пригнічувальний, так і стимулюючий ефект опромінення.

*Ключові слова:* зелені водорості, мікрохвильове випромінювання, фотолюмінесценція, чисельність клітин.

У зв'язку з мінливістю екологічної ситуації важливо забезпечити контроль за впливом антропогенних чинників на живі організми. Так, для діагностики стану водоростей у природних умовах останнім часом активно застосовується люмінесцентний метод. Він заснований на тому, що під дією зовнішнього фактора, внаслідок порушення стану фотосинтетичних мембран, відбуваються зміни їхніх оптичних властивостей. Це пов'язано з чутливістю фотосистеми II до таких чинників, як підвищена температура, різного типу забруднення і т. ін. [7].

Мета роботи — порівняти реакції різних видів зелених водоростей на мікрохвильову радіацію дециметрового діапазону. Виходячи з того, що побічним ефектом дії мікрохвильової радіації є нагрівання, ми підібрали види, від яких слід очікувати різну резистентність до підвищених температур. Для контролю за функціональним станом водоростей ми застосовували люмінесцентний аналіз та підрахунок кількості клітин.

**Матеріал і методика досліджень.** В експериментах використовували зелені водорості з альгологічної колекції кафедри ботаніки біологічного факультету Київського національного університету ім. Тараса Шевченка (АСКУ).

За ступенем толерантності до підвищених температур досліджені зразки характеризуються наступним чином. Як найбільш стійку було відібрано культуру *Chlorella vulgaris* Beijer. (АСКУ 531-06), яка, як відомо, є надзвичайно

© Григор'єва О. О., Вакуленко О. В., Даценко О. І., Березовська М. А., 2010

резистентною до змін навколишнього середовища і широко розповсюджена у найрізноманітніших місцезростаннях [11]. Штам *Coleochlamys sp.* (АСКУ 821-08), який був ізольований зі зразків ґрунту на території антарктичної станції і пристосований до зростання в умовах холодного клімату, було відібрано нами як, імовірно, найменш стійкий до підвищених температур. Щодо *Chlamydomonas actinochloris* Deason et Bold (АСКУ 706-06) — нам не відомі його особливі реакції на зовнішні чинники, зокрема нагрівання. Проте, як водорість, що була ізольована з ґрунту штату Техас (США), вона мала б проявляти доволі високу стійкість до підвищених температур. Культури вирощували у рідкому середовищі Болда (3N BBM) з потрібною кількістю азоту при температурі +22°C [10].

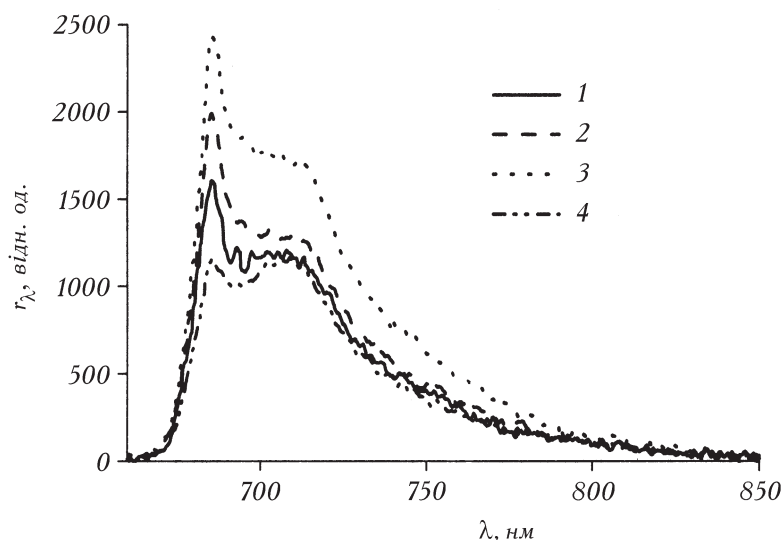
Об'єкти опромінювали у скляному посуді, об'єм суспензії становив 100 мл. Як джерело мікрохвильового випромінювання в експериментах використано стандартну побутову мікрохвильову піч, яка працює на магнетроні з частотою генерації  $\nu = 2450$  МГц, що відповідає діапазону частот деяких антропогенних джерел (довжина хвилі випромінювання  $\lambda \approx 12$  см). Температуру суспензії вимірювали до і після опромінювання. Дозу поглиненої радіації  $D$  визначали за формулою  $D = c(t_2 - t_1)$ , де  $c = 4,2$  Дж/(г·°C) — питома теплоємність води, а  $t_1$  і  $t_2$  — початкова та кінцева температура суспензії [3]. При експозиції 10, 20 та 30 с температура піднімалася відповідно до 35, 45 та 55°C, а поглинена доза становила 45, 85 та 130 Дж/г. У наших попередніх дослідженнях [1] було показано, що вплив мікрохвильового опромінювання здебільшого термічний, хоча існує й надтеплова складова.

Функціональний стан досліджуваних водоростей контролювали за ефективністю фотолюмінесценції (ФЛ) хлорофілу. Люмінесценція збуджувалася випромінюванням аргонного лазера з довжиною хвилі 488 нм та потужністю 19 мВт. Спектри вимірювали при температурі рідкого азоту. Отримані криві було призведено до однакової чисельності клітин, щоб виключити вплив росту біомаси на інтенсивність світіння. Зазначимо, що ознаками погіршення функціонального стану рослини в літературі вважається як зменшення інтенсивності люмінесценції, так і зменшення відношення інтенсивності смуг спектра  $f = I(\lambda_{II}) / I(\lambda_I)$ , де  $I(\lambda_I)$  і  $I(\lambda_{II})$  — інтенсивність в максимумах смуг випромінювання хлорофілу  $a$  відповідно у фотосистемах I і II [9].

Підрахунки кількості клітин у культурі здійснювали на 1, 2, 5 та 7-у добу експерименту за методикою [6]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми PAST\_1\_65.

### Результати досліджень та їх обговорення

Склад спектрів ФЛ у всіх досліджуваних видів був фактично однаковий: спостерігалися дві основні смуги випромінювання хлорофілу  $a$  з максимумами на  $\lambda_I = 710 \div 720$  нм і  $\lambda_{II} = 685$  нм. Відомо, що пік в області  $\lambda_{II}$  відповідає хлорофілу  $a$  у фотосистемі (ФС) II, і саме зміни його інтенсивності свідчать про стан реакційних центрів цієї фотосистеми [2, 7]; смуга в області  $\lambda_I$  нале-



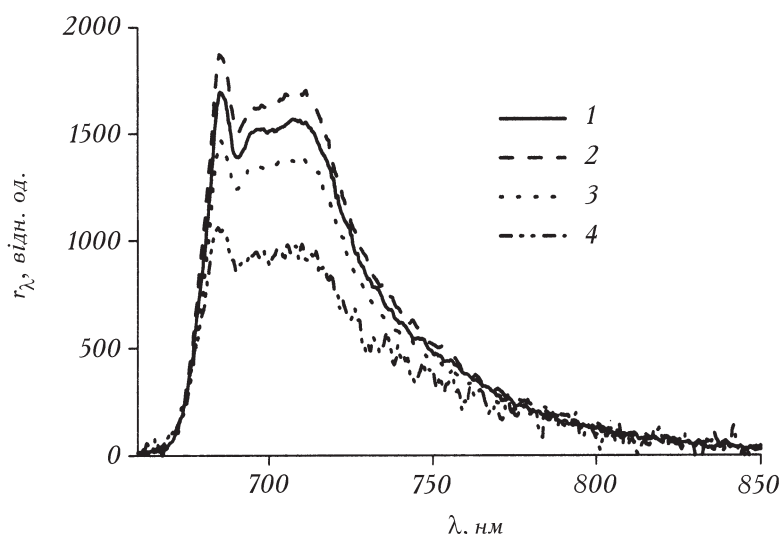
1. Спектри ФЛ культури *Ch. actinochloris* в 1-у добу після мікрохвильової обробки. Тут і на рис. 2—9: 1 — контроль; 2 — опромінення в дозі 45 Дж/г; 3 — опромінення в дозі 85 Дж/г; 4 — опромінення в дозі 130 Дж/г. Тут і на рис. 2, 4, 5, 7, 8: по осі ординат відкладено величину, пропорційну кількості випроміненої енергії на одиницю спектрального інтервалу.

жить ФС I. Слід зазначити, що в спектрі *Ch. actinochloris* домінувала смуга  $\lambda_{II}$ , у спектрах інших двох видів інтенсивнішою була смуга  $\lambda_I$ .

Обробка мікрохвильовою радіацією в дозах 45 та 85 Дж/г фактично не вплинула на форму спектра *Ch. actinochloris*, проте збільшилася інтегральна інтенсивність люмінесценції, яку можна оцінити за величиною площі під спектральною кривою (рис. 1). Опромінювання в найвищій дозі 130 Дж/г, навпаки, дещо знизило ефективність люмінесценції, причому це стосується в першу чергу смуги  $\lambda_{II} = 685$  нм.

Отже, збільшення ефективності люмінесценції, що спостерігалось в результаті опромінення в дозах 45 та 85 Дж/г, свідчить, очевидно, про поліпшення функціонального стану водорості *Ch. actinochloris*, адже підвищення інтенсивності ФЛ можна трактувати як збільшення кількості активних хлоропластів у клітинах. Відповідно, підвищення дози до 130 Дж/г погіршило функціональний стан рослини, і це проявилось як у значному зменшенні кількості клітин, так і у зниженні ефективності люмінесценції та показника  $f$  (відношення інтенсивності смуг  $\lambda_{II}$  і  $\lambda_I$ ) зі значення приблизно 1,4 до 1,0.

На 7-у добу експерименту відносна ефективність ФЛ контролю і зразків, які було опромінено у дозах 45 та 85 Дж/г, відрізнялася мало, в межах похибки підрахунку кількості клітин (рис. 2). У зразка з максимальною дозою опромінення через 7 діб спектр практично не відрізнявся від інших спектрів на графіку за формою, проте інтенсивність люмінесценції була суттєво меншою. Помітно також, що в спектрах як опромінених зразків, так і контролю



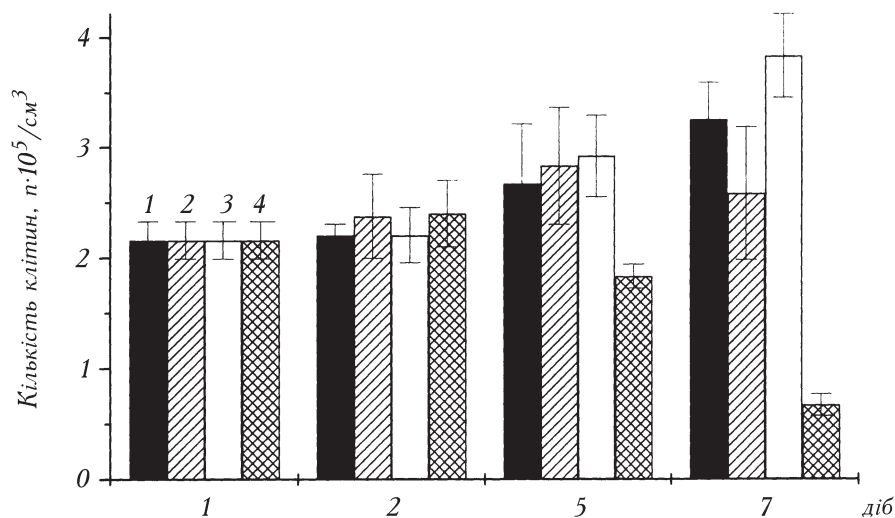
2. Спектри ФЛ культури *Ch. actinochloris* на 7-у добу після мікрохвильової обробки.

відношення  $f$  зменшилося в порівнянні з першим днем експерименту (з 1,4 до 1,1). Оскільки воно змінилося і у контрольного зразка, не можна вважати це наслідком опромінення. На нашу думку, зменшення внеску лінії  $\lambda_{II} = 685$  нм у спектр відбулося через старіння культури, адже у старій культурі, як виявилось в результаті окремих досліджень, у спектрі домінує саме смуга  $\lambda_I = 710$  нм.

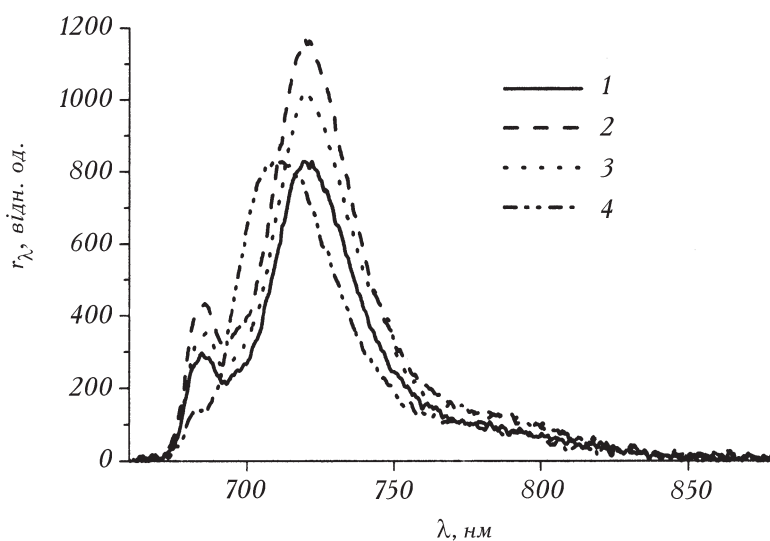
Дані по кількості клітин на 7-у добу після опромінення добре корелюють із люмінесцентними характеристиками (рис. 3). Так, зразки, оброблені в дозах 45 та 85 Дж/г, мало відрізнялися за чисельністю клітин, тоді як внаслідок опромінення в дозі 130 Дж/г кількість клітин у зразку суттєво знизилась. Отже, на розвиток клітин *Ch. actinochloris* опромінення в дозах, що не перевищують 85 Дж/г, суттєво не впливає, а доза 130 Дж/г пригнічує як розвиток культури, так і інтенсивність люмінесценції.

У наступного досліджуваного виду *Ch. vulgaris* при опроміненні в дозах 45 та 85 Дж/г так само, як і в попередньої культури, на 1-у добу експерименту відбулася певна стимуляція ФЛ порівняно з контролем, форму самих спектрів обробка в таких дозах не змінила (рис. 4). Найвища доза 130 Дж/г, як і в попередньому випадку, вплинула лише на інтенсивність лінії  $\lambda_{II} = 685$  нм. Водночас, максимум смуги  $\lambda_I$  змістився в короткохвильовий бік приблизно на 10 нм.

Зменшення інтенсивності на довжині хвилі 685 нм можна трактувати як пригнічення фотосинтетичних процесів, а щодо зміщення максимуму смуги  $\lambda_I$  можна припустити, що воно зумовлене розпадом полімерів хлорофілу, які випромінюють у більш довгохвильовій області, ніж мономери [5]. Потрібно відзначити, що в експериментах із попередньою культурою такого зміщення



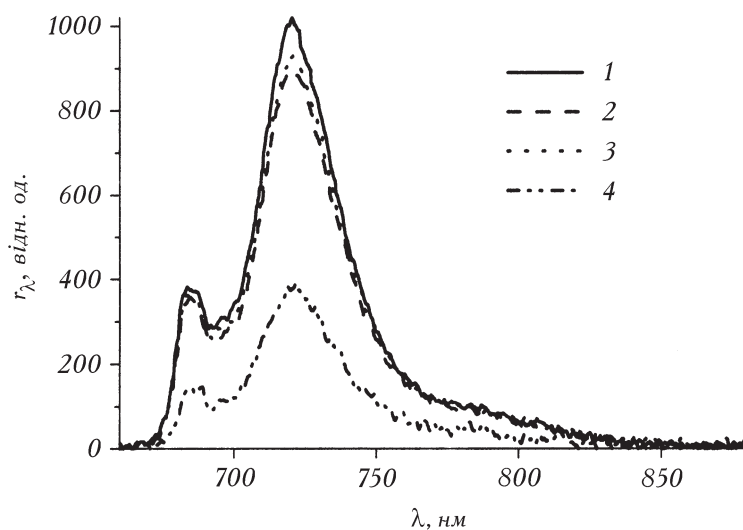
3. Динаміка чисельності клітин *Ch. actinochloris* після впливу мікрохвильової радіації.



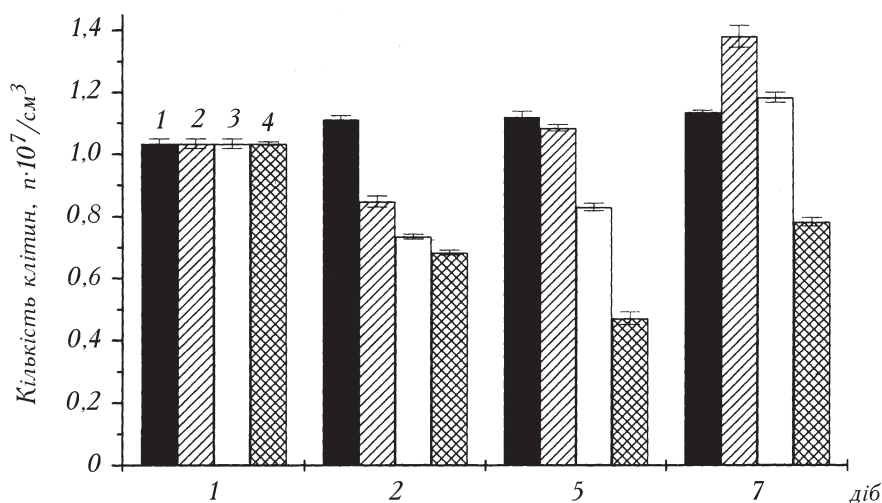
4. Спектри ФЛ культури *Ch. vulgaris* в 1-у добу після мікрохвильової обробки.

не спостерігалось. Але зазначимо, що у *Ch. actinochloris* максимум люмінесцентної смуги  $\lambda_1$  початково знаходився в області  $\sim 710$  нм.

Результати люмінесцентних досліджень на 7-у добу експерименту з *Ch. vulgaris* виявилися подібними до отриманих у дослідгах з *Ch. actinochloris*. Зокрема, відмінності у спектрах зразків, опромінених у різних дозах, зникли (рис. 5). Значення інтенсивності люмінесценції для контролю і зразків,



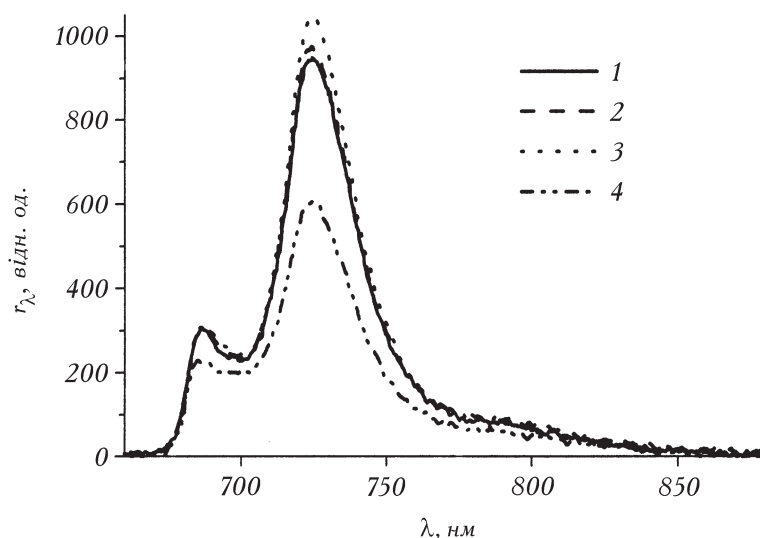
5. Спектри ФЛ культури *Ch. vulgaris* на 7-у добу після мікрохвильової обробки.



6. Динаміка чисельності клітин *Ch. vulgaris* після впливу мікрохвильової радіації.

які було опромінено у дозах 45 та 85 Дж/г, відрізнялися мало, а для культури, що отримала найвищу дозу 130 Дж/г, інтенсивність виявилася суттєво меншою. Це корелює з даними по чисельності клітин (рис. 6).

Для зразків культури *Coleochlamys* sp., які було оброблено у дозах 45 і 85 Дж/г, значення інтенсивності люмінесценції були приблизно такі, як і в контрольного зразка; те ж саме можна сказати про спектри (рис. 7). Внаслідок опромінення в максимальній дозі ефективність люмінесценції помітно зменшилась, однак співвідношення  $f$  дещо зросло. Таке зростання

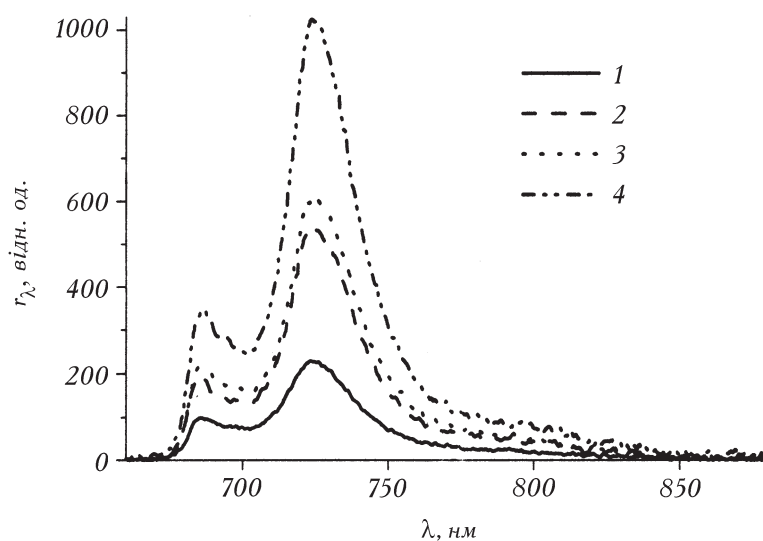


7. Спектри ФЛ культури *Coleochlamys* sp. в 1-у добу після мікрохвильової обробки.

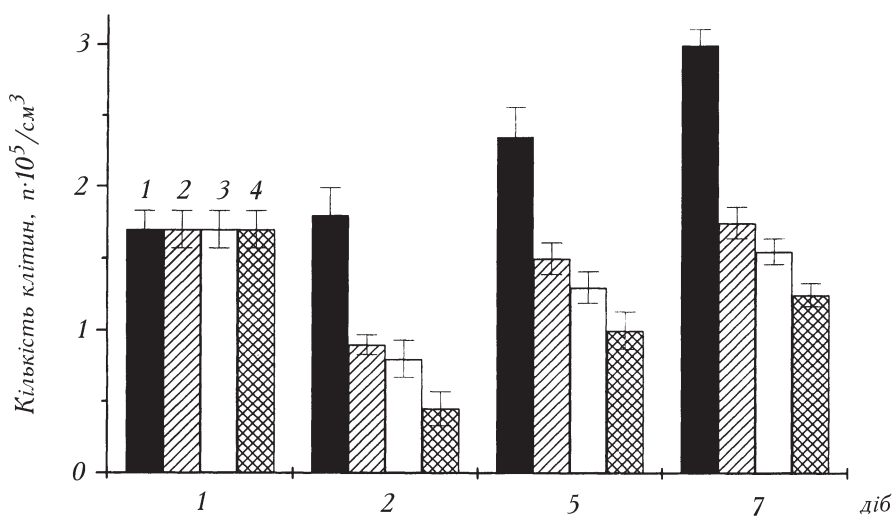
відносної інтенсивності ФЛ короткохвильової смуги пояснюється, скоріш за все, її перекриванням із новою смугою  $\lambda \approx 695$  нм, яка в даному випадку проявилася лише як зменшення провалу між смугами  $\lambda_I$  і  $\lambda_{II}$  в порівнянні зі спектром контрольного зразка. Очевидно, вона з'явилася в результаті опромінення і характеризується в літературі [4] як випромінювання феофітину ФС II. Її появу можна трактувати як порушення процесів міграції енергії в ФС II, через що випромінювальна рекомбінація відбувається, на відміну від контрольного зразка, не в хлорофілі, а в іншому пігменті. Відзначимо, що така смуга чітко проявилася й на спектрах для *Ch. actinochloris* на 7-у добу експерименту (див. рис. 2). Тут її поява пов'язана, очевидно, зі старінням культури.

Спектри люмінесценції *Coleochlamys* sp. на 7-у добу після опромінення наведено на рисунку 8. На відміну від двох попередніх культур, відносна інтенсивність ФЛ зі збільшенням дози у всіх варіантах досліду зростає, а особливо при обробці в дозі 130 Дж/г, коли ефективність люмінесценції була найвищою. Разючу відмінність із попередніми результатами ми отримали при зіставленні люмінесцентних показників із кількістю клітин цієї культури (рис. 9). Так, за найвищої дози опромінення, коли кількість клітин у зразку виявилася найнижчою, інтенсивність світіння — найвищою за всі варіанти досліду, включаючи контроль (див. рис. 8).

Пояснити цей феномен можна, простеживши динаміку чисельності клітин протягом усього експерименту. Порівняння даних для *Ch. actinochloris* та *Ch. vulgaris* показало (див. рис. 3, 6), що динаміка чисельності їхніх клітин не дуже відрізнялася. Так, розвиток культури пригнічувався при обробці в дозі 130 Дж/г, та й після опромінення у менших дозах спостерігалось тимчасове зниження кількості клітин. Максимальне пригнічення реєструвалося на 5-у добу спостереження для *Ch. vulgaris* і на 7-у добу для *Ch. actinoch-*



8. Спектри ФЛ культури *Coleochlamys* sp. на 7-у добу після мікрохвильової обробки.



9. Динаміка чисельності клітин *Coleochlamys* sp. після впливу мікрохвильової радіації.

*loris*. Натомість, для *Coleochlamys* sp. мінімальну кількість клітин у дослідних зразках відмічено на 2-у добу, із подальшим планомірним наростанням, внаслідок якого максимальна чисельність клітин спостерігається на 7-у добу експерименту (див. рис. 9). Очевидно, що саме активні відновні процеси у клітині і відображалися високим рівнем світіння.

Відомо, що за інтенсивного прогріву листа кукурудзи спостерігалася більш висока інтенсивність люмінесценції хлорофілу, ніж у разі низькотем-



пературного вирощування, що пояснюється інтенсивними репаративними процесами у тканинах [8]. Можна констатувати, що для антарктичної водорості доза 130 Дж/г, за якої температура піднялася до 55°C, виявилася більш дієвою, ніж для інших досліджуваних видів, що спричинило швидке падіння чисельності клітин. Натомість ця культура характеризується й найвищою здатністю до відновлення, про що свідчать люмінесцентні вимірювання та кількісні підрахунки.

### Висновки

Досліджені водорості по-різному відреагували на вплив мікрохвильової радіації. Для *Ch. vulgaris* та *Ch. actinochloris* існує кореляція між чисельністю та ефективністю ФЛ: опромінення у дозах 45 та 85 Дж/г справило стимулюючий вплив — як на інтенсивність люмінесценції, так і на чисельність клітин. У *Coleochlamys* sp. спостерігається розбіжність між цими двома показниками: чисельність клітин в усіх дослідних варіантах нижча, ніж у контролі, у той час як інтенсивність ФЛ на останній день досліду перевищувала контроль. На прикладі *Coleochlamys* sp. видно, що саме активні відновні процеси в клітинах супроводжуються високим рівнем світіння.

Зміна форми низькотемпературного спектра ФЛ відбувається за вищих доз опромінення, ніж зміна її інтенсивності, тому останній показник слід вважати більш чутливою характеристикою функціонального стану рослини. Доза 130 Дж/г виявила негативний вплив на чисельність водоростей незалежно від виду.

\*\*

*Исследованы спектры фотолюминесценции и динамика численности клеток разных видов зеленых водорослей после облучения микроволновой радиацией дециметрового диапазона. Показано, что в зависимости от дозы облучения изменяются как спектр и интенсивность фотолюминесценции, так и количество клеток в культуре, причем эти показатели не всегда коррелируют между собой. Обнаружен как угнетающий, так и стимулирующий эффект облучения.*

\*\*

*The photoluminescence spectra and the dynamics of cell quantity in green algae after microwave irradiation are studied. It is shown that both the spectra and photoluminescence intensities and cell quantities are changed depending on absorption dose. These indices do not always correlate. Both oppressing and stimulating effect of irradiation are observed.*

\*\*

1. Вакуленко О.В., Григорьева О.О, Даценко А.И. Люминесцентный контроль функционального состояния *Vallisneria spiralis* L., облученной микроволновой радиацией // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2010. — Т. 50, № 2. — С. 211—216.
2. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений: Теоретические и практические аспекты. — М.: Наука, 1990. — 200 с.

3. Григор'єва О.О. Вплив надвисокочастотного опромінення як екологічного фактора на деякі гідробіонтні організми: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2005. — 20 с.
4. Гуляев Б.А., Тетенькин В.Л. Критерий нативности пигмент-белковых комплексов и особенности их организации in vivo // Изв. АН СССР. Сер. биология. — 1983. — № 4. — С. 536—552.
5. Карапетян Н.В. Фотосистема 1 цианобактерий: организация и функции // Успехи биол. химии. — 2001. — Т. 41. — С. 39—76.
6. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Отв. ред. В. И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 552 с.
7. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Биология. — 2000. — С. 7—13.
8. Силаева А.М. Структура хлоропластов и факторы среды. — Киев: Наук. думка, 1978. — 204 с.
9. Фатеева Н.Л. Дистанционная диагностика состояния растений на основе метода лазерно-индуцированной флуоресценции: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. — Новосибирск, 2007. — 19 с.
10. Králová K., Masarovičová E., Győryová K. The physiological response of green algae (*Chlorella vulgaris*) to pH-dependent inhibitory activity of some zinc (II) compounds: carboxylato- and halogenocarboxylatozinc (II) complexes // Chem. Pap. — 2003. — N 58 (5). — P. 353—356.
11. Bischoff H. W., Bold H. C. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species // Phycol. Stud. 4. Univ. Texas Publ.— 1963. — N 6318. — P. 1—95.