

УДК 581.5+535.37:58.02

**О. В. Вакуленко, О. О. Григорьева, М. А. Березовская,
А. И. Даценко**

**ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ
ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ В ЖИДКИХ
СРЕДАХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ**

Кратко изложены особенности применения люминесцентных методов для диагностики функционального состояния одноклеточных водорослей в жидкой среде. Показано, что применение традиционного метода индукции флуоресценции в данном случае затруднено, но диагностику можно осуществлять по статической интенсивности и спектрам фотолюминесценции хлорофилла *a* при комнатной и низких температурах. Обозначены люминесцентные параметры, по которым можно оценивать функциональное состояние клеток в культуре. Показано, что при измерениях следует принимать во внимание длину волны возбуждения. Предложен метод, позволяющий минимизировать влияние индукции флуоресценции на результаты измерений.

Ключевые слова: одноклеточные водоросли, диагностика, фотолюминесценция, функциональное состояние.

С развитием общества всё более ощутимым становится влияние человека на окружающую среду. В связи с этим приходится регулярно контролировать состояние природных объектов, чтобы иметь возможность вовремя принять меры по их сохранению и защите. Для оценки степени риска используется экологический мониторинг, позволяющий прогнозировать дальнейшее развитие экосистемы в целом. В данном случае очень важно вовремя получить информацию о состоянии биологических объектов, чтобы предотвратить необратимые изменения в них.

Одним из экспресс-методов получения такой информации служит люминесцентный метод. Общее функциональное состояние растения можно оценить по состоянию фотосинтетического аппарата. Неотъемлемой его составляющей является хлорофилл *a* — пигмент, способный люминесцировать в красной и ближней инфракрасной области. Таким образом, люминесцентные свойства растения дают представление о его функциональном состоянии.

© О. В. Вакуленко, О. О. Григорьева, М. А. Березовская, А. И. Даценко, 2013

Очень информативным и поэтому часто применяемым способом оценки фотосинтетического аппарата растения является метод индукции флуоресценции [9], основанный на эффекте Каутского, согласно которому эффективность флуоресценции хлорофилла при неизменной интенсивности возбуждения не остается постоянной, а изменяется — сначала происходит относительно быстрое нарастание, после чего начинается продолжительный спад. Однако этот метод применим преимущественно в исследованиях многоклеточных растений, где возбуждается и люминесцирует, в основном, поверхность объекта. Использование его в отношении одноклеточных водорослей в суспензиях встречает некоторые сложности.

Во-первых, оптическое возбуждение люминесценции в кювете осуществляется неоднородно, поскольку с углублением в среду свет поглощается и рассеивается — и, соответственно, ослабляется. Поэтому клетки, расположенные на разном расстоянии от источника возбуждения, находятся в неодинаковых условиях, в то время как динамика индукции флуоресценции существенно зависит от интенсивности возбуждения [9]. Во-вторых, всегда присутствующее конвективное перемешивание жидкости постоянно непредвиденным образом меняет местами слои клеток, что еще больше усложняет измерения.

Таким образом, остается лишь возможность люминесцентной диагностики таких биосистем при помощи измерения статических характеристик спектров люминесценции.

Однако явление индукции люминесценции способно исказить результаты таких измерений. Ведь характерное время быстрой компоненты деградации интенсивности флуоресценции хлорофилла составляет десятки секунд [1], к тому же есть и длительная компонента с характерным временем, которое оценивается десятками минут [14]. При низких температурах деградация существенно замедляется, хотя также имеет место [15]. Полностью устранить влияние индукции флуоресценции на результаты можно, только применив слабое возбуждение, что при малой численности клеток в культуре не всегда реализуемо. В этих условиях слабым будет и уровень люминесцентного сигнала; здесь еще нужно принять во внимание тот факт, что при малых уровнях накачки квантовый выход фотолюминесценции (ФЛ) хлорофилла не превышает 1% [10].

В связи с этим, для исследования люминесцентных свойств суспензий водорослей приходится использовать сильное возбуждение, однако для минимизации влияния деградации интенсивности следует принять некоторые меры.

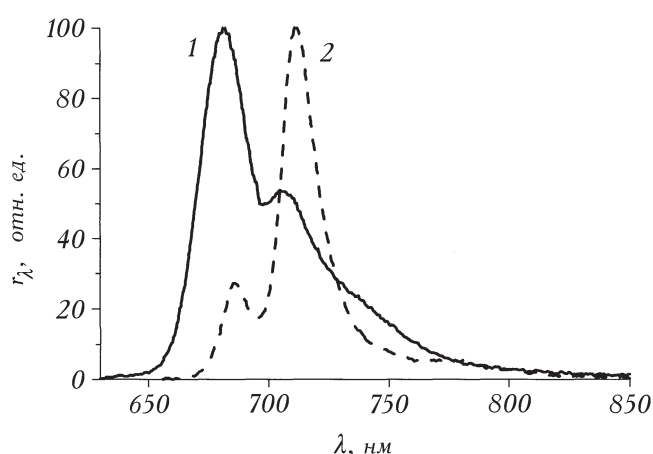
Например, можно взять достаточно большой объем суспензии, облучая при этом относительно малую его часть, сделав так, чтобы под возбуждением всякий раз находились новые клетки. В идеале нужно непрерывно прокачивать суспензию через опытную кювету, однако можно просто взять достаточно большой сосуд, а суспензию в нем постоянно перемешивать, при этом возбуждающий свет должен подаваться тонким пучком, что легко реализовать при использовании лазера. Тогда одновременно освещается очень

небольшая часть клеток, а каждая отдельная клетка пребывает под освещением относительно малое время, что существенно снижает влияние индукции на полученные данные. Так, во время проведенных измерений со сфокусированным лазерным пучком при общем количестве суспензии 7 см^3 в кювете возбуждался одновременно объем около $0,02 \text{ см}^3$, то есть $1/350$ часть ($\sim 0,3\%$) общего объема [5]. Соответственно и средняя доза облучения клеток уменьшалась в 350 раз по сравнению с той, которую они получали бы при постоянной засветке той же мощности. При этом за 5 мин интенсивность в максимуме снижалась приблизительно на 20%, тогда как при непрерывном возбуждении листа высшего растения при подобных условиях интенсивность падала в три раза [14].

Важно, чтобы измерения на разных образцах проводились в одних и тех же условиях. В частности, предварительная настроечная засветка (например, при подготовке к измерениям) для всех образцов должна быть одинаковой длительности и интенсивности. Тогда влияние индукции люминесценции на все результаты также будет одинаковым.

Показателем функционального состояния клеток может быть как общая интенсивность люминесценции, пропорциональная количеству хлорофилла в тилакоидах, так и отношение интенсивности в максимумах характерных полос излучения этого пигмента. Как известно, спектр ФЛ хлорофилла имеет две основные полосы [4]. При комнатной температуре доминирует узкая линия с максимумом при длине волны около 685 нм, обусловленная излучением хлорофилла *a* в фотосистеме II (рис. 1). Рядом с ней наблюдается широкая полоса в области 705—740 нм, ее источником считают фотосистему I [6]. При низких температурах эта полоса становится преобладающей в спектре. Максимумы полос при охлаждении могут смещаться, поскольку обе они являются сложными: их компоненты обусловлены излучением различных хлорофилл-белковых комплексов [13], перенос энергии между которыми при разных температурах может проходить по-разному. Некоторые исследователи [12] полагают, что фотосистема II растений более чувствительна к негативному влиянию среды и отношение $f = I(\lambda_{685}) / I(\lambda_{740})$ также используется как показатель их функционального состояния.

Безусловно, интенсивность люминесценции суспензии не может быть полной характеристикой функционального состояния



1. Спектры ФЛ культуры *Phaeodactylum tricorneratum* при комнатной температуре (1) и температуре жидкого азота (2) [8]. Длина волны возбуждения $\lambda = 488 \text{ нм}$.

клеток для контроля состояния культуры в лаг-фазе. Их количество непрерывно растет, а с ним и число центров люминесценции, так что общая интенсивность ФЛ монотонно повышается, даже если состояние клеток остается неизменным. В этом случае целесообразно делать перерасчет полученного значения интенсивности на количество клеток в культуре. Интенсивность, приведенная к количеству клеток (удельная интенсивность), показывает среднюю эффективность излучения одной клетки и, соответственно, среднее функциональное состояние клеток в культуре. Поэтому люминесцентные исследования в этом случае должны обязательно сопровождаться учетом количества клеток.

Иллюстрацией к сказанному может быть рисунок 2. Как видим, одновременно с увеличением численности клеток в культуре повышается и общая интенсивность люминесценции, однако удельная интенсивность при этом остается постоянной.

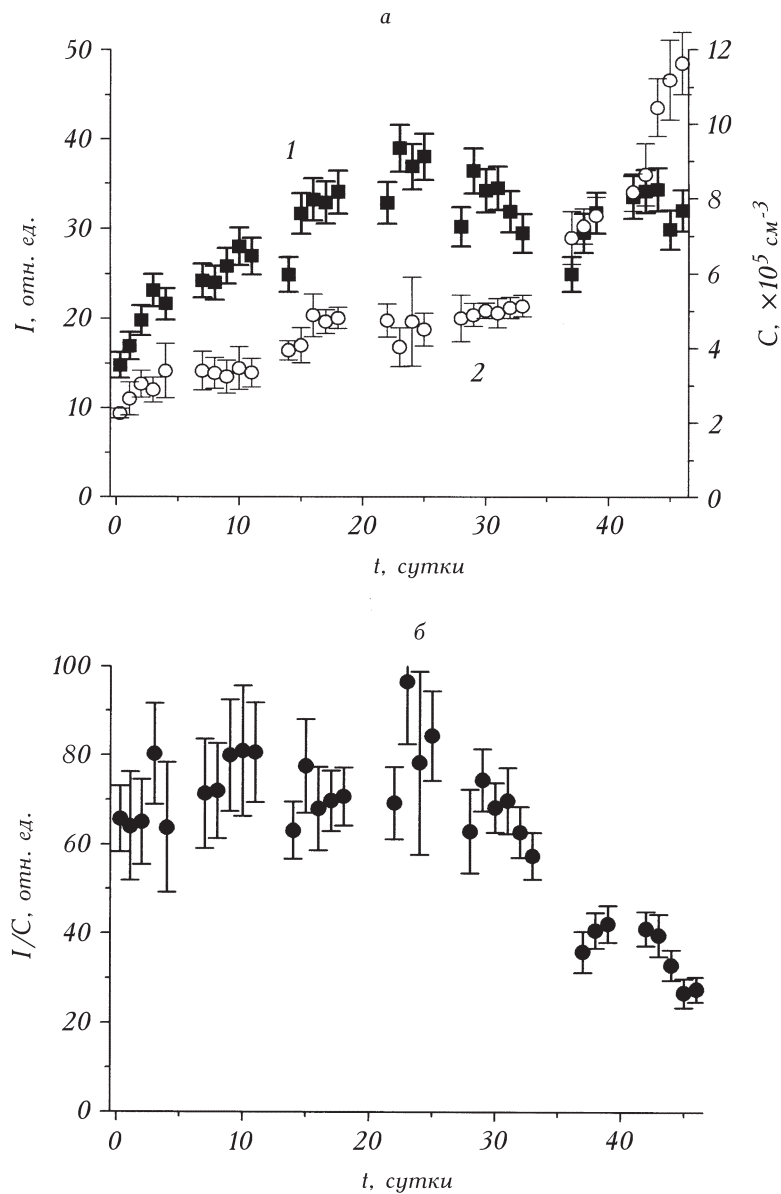
Во время исследований следует также учитывать поглощающие свойства суспензии. При малой концентрации клеток суспензия прозрачна для возбуждающего света, но с увеличением концентрации клеток возбуждающий свет поглощается все сильнее. Если пренебречь рассеянием и собственным поглощением среды, то интенсивность света $I_{\text{п}}$, поглощенного веществом в кювете, описывается согласно закону Бугера — Ламберта:

$$I_{\text{п}} = I_0(1 - e^{-kl}),$$

где I_0 — начальная интенсивность возбуждения; l — путь, пройденный лучом внутри кюветы; k — натуральный показатель поглощения, в данном случае он пропорционален концентрации клеток C в суспензии (закон Бера). Если их функциональное состояние постоянно, то эффективность люминесценции не меняется: ее интенсивность будет пропорциональна количеству поглощенного возбуждающего света.

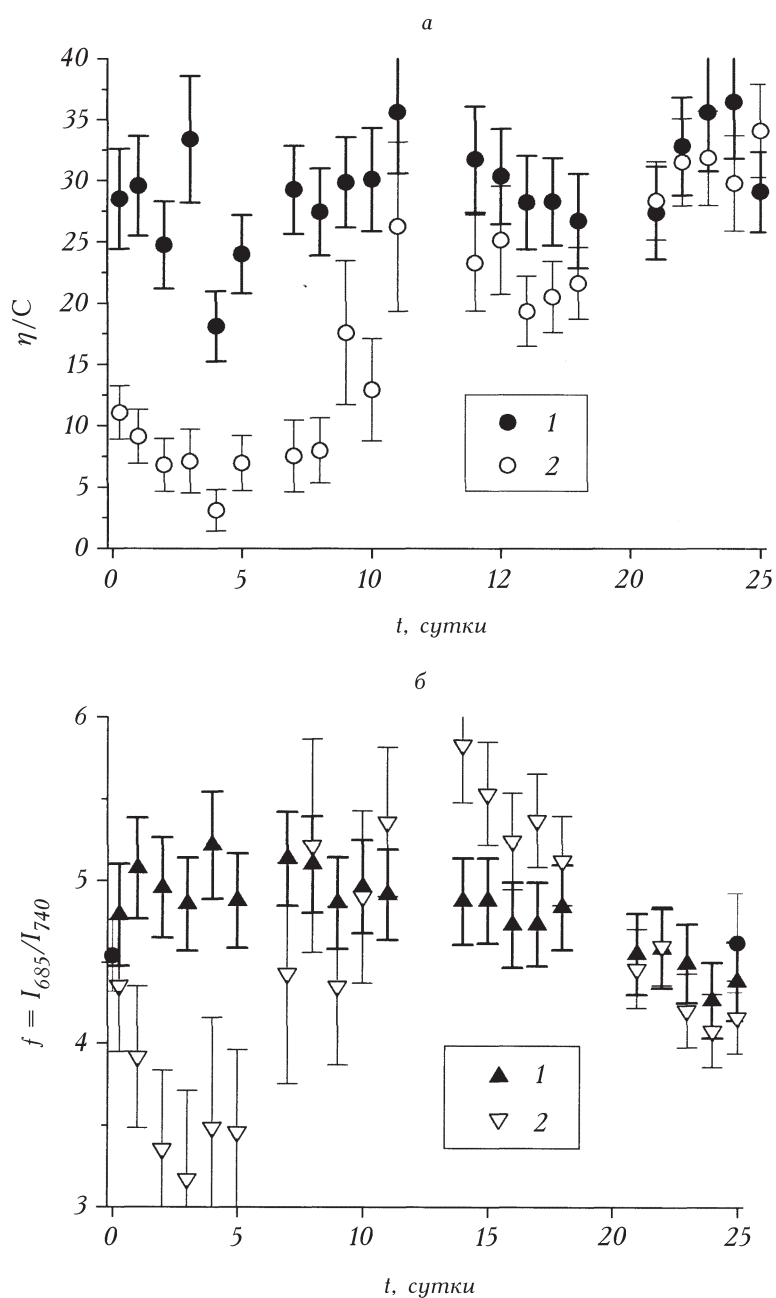
Поэтому с увеличением численности клеток, то есть с уменьшением прозрачности суспензии, рост интенсивности люминесценции культуры постепенно замедляется, и ее значение выходит на плато (см. рис. 2, а). При пересчете же на одну клетку значение удельной интенсивности на конечном участке падает, хотя это еще не означает ухудшения функционального состояния клеток (см. рис. 2, б). Для получения более корректных результатов следует вместо интенсивности люминесценции использовать значение ее эффективности, то есть отношение интенсивности ФЛ к интенсивности поглощенной части возбуждения. Хотя нужно сказать, что вычислить последнее значение исходя из величины пропускания часто бывает довольно сложно, поскольку приходится учитывать и потери на рассеивание, которые также увеличиваются с ростом плотности культуры.

Как уже указывалось, для диагностики функционального состояния водорослей можно использовать величину f — относительную интенсивность полос в спектре. Как и эффективность люминесценции, при ухудшении функционального состояния клеток она уменьшается (рис. 3). Однако необходимо помнить, что в процессе развития культур она тоже не остается не-



2. Динамика интенсивности люминесценции (I) и численности клеток (2) развивающейся культуры *Chlamydomonas actinochloris* (а), а также ее удельной интенсивности ФЛ (б) [7]. Здесь и на рис. 3 вертикальными отрезками прямых показана удвоенная величина статистической ошибки для доверительной вероятности 95%.

изменной. На рисунке можно видеть, что даже для контрольной культуры величина f вначале имеет тенденцию к возрастанию, а затем по мере старения культуры убывает. Такая особенность спектров ФЛ хлорофилла характерна как для развивающихся культур водорослей [2, 5, 7], так и для высших растений в период их вегетации [12].



3. Динамика эффективности люминесценции (а) и отношения f (б) клеток контрольной культуры *Chlamydomonas actinochloris* (1) и облученной микроволновым излучением в дозе 122 Дж/г (2) [5].

При диагностике состояния растений с помощью фотолюминесцентных измерений необходимо принимать во внимание длину волны возбуждения. Кроме хлорофилла *a*, молекулы которого являются центрами люминесценции, некоторые антенные комплексы фотосистем содержат и другие пиг-

менты, прежде всего хлорофилл *b* и каротиноиды [13], имеющие спектр поглощения, отличный от спектра хлорофилла *a*. Их функция — расширение спектральной зоны фотосинтеза. Они поглощают свет и передают возбуждение хлорофиллу *a*. Таким образом, возбуждение люминесценции последнего, в зависимости от длины волны, может быть как прямым, так и опосредованным — через пигмент другого типа. В последнем случае люминесценция называется сенсibilизированной, и бывает, что ее эффективность у клеток с заведомо худшим функциональным состоянием оказывается выше, чем у контрольной культуры. В частности, такой случай зарегистрирован для культуры *Phaeodactylum tricornutum* при температуре жидкого азота [8].

Проведение низкотемпературных люминесцентных измерений часто бывает целесообразным, особенно при малых объемах, малой плотности культуры либо в условиях слабого возбуждения. В первую очередь это обусловлено тем, что при низкой температуре эффективность люминесценции, как правило, выше. Это объясняется активизацией с повышением температуры процессов безызлучательной рекомбинации в молекулах, когда энергия возбуждения вместо излучения безвозвратно переходит в тепловую — так называемое температурное тушение люминесценции [3]. Конечно, перемешивание замерзшей суспензии невозможно, что не позволяет снизить влияние индукции люминесценции на результаты, однако, как уже упоминалось, при охлаждении образца деградация интенсивности существенно замедляется. Так, со снижением температуры от комнатной до 80 К характерное время деградации снижается в несколько раз [14].

В заключение необходимо напомнить, что люминесцентные параметры растений сильно зависят не только от стадии их развития, но и от многих других факторов (освещенность, температура и т. д.) [11]. Поэтому использовать их для диагностики функционального состояния объекта во время исследований следует только в сравнении с контрольным образцом.

Заклучение

При диагностике функционального состояния жидких культур одноклеточных водорослей метод индукции флуоресценции практически непригоден. Представление о функциональном состоянии клеток могут дать такие люминесцентные показатели, как эффективность фотолюминесценции и отношение интенсивности в максимумах основных полос ее спектра. При измерении этих параметров необходимо принять меры по устранению влияния индукции флуоресценции. В процессе измерений следует учитывать длину волны возбуждения.

**

Коротко викладено особливості застосування люмінесцентних методів для діагностики функціонального стану одноклітинних водоростей у рідкому середовищі. Показано, що застосування традиційного методу індукції флуоресценції в даному випадку ускладнюється, проте діагностику можна здійснювати за статичною інтенсивністю та спектрами фотолюмінесценції хлорофілу а як при кімнатній, так і при низьких температурах. Зазначено люмінесцентні параметри, за якими можна оцінювати функціональний стан клітин у культурі. Показано, що при вимірюваннях

слід брати до уваги довжину хвилі збудження. Запропоновано метод, що дозволяє мінімізувати вплив індукції флуоресценції на результати вимірів.

**

Features of the luminescent method application for diagnostics of the functional state of one-celled algae in liquid medium are outlined. Application of the traditional method of fluorescence induction is shown to be difficult in this case, but the diagnostics can be made by the static intensity and luminescence spectra of chlorophyll a at room and low temperatures. The luminescent parameters that can characterize the cell functional state in the culture are indicated. It is shown that the excitation wavelength should be taken into account in the measurements. The method allowing one to minimize the fluorescence induction effect on the results of measurements is proposed.

**

1. Борисов Б. А., Быков О. Д. Спектральные изменения флуоресценции хлорофилла в период индукции фотосинтеза // Оптика и спектроскопия. — 2008. — Т. 104, № 2. — С. 219—222.
2. Вакуленко О.В., Даценко А.И., Березовская М.А., Григорьева О.О. Фотолюминесцентная диагностика *Chlorella vulgaris* в процессе развития // Мониторинг окружающей среды: Сб. материалов междунар. науч.-практ. конф., Брест, 21—22 окт. 2010 г. — Брест, 2010. — С. 148—151.
3. Вакуленко О.В., Даценко О.И. Люминесценція напівпровідників: навчальний посібник. — К.: ВПЦ Київський університет, 2011. — 223 с.
4. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты. — М.: Наука, 1990. — 200 с.
5. Григорьева О.О., Березовская М.А., Даценко А.И. Развитие культуры *Chlamydomonas actinochloris* после микроволнового облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2012. — Т. 52, № 3. — С. 293—297.
6. Гуляев Б. А., Тенькин В. А. Критерий нативности пигмент-белковых комплексов и особенности их организации in vivo // Изв. АН СССР. Сер. биология. — 1983. — № 4. — С. 536—552.
7. Даценко О.И., Березовська М.А., Григор'єва О.О. Рости та функціональні характеристики культури *Chlamydomonas actinochloris* за наявності поверхневої бензинової плівки // Гидробиол. журн. — 2012. — Т. 48, № 1. — С. 78—85.
8. Даценко О.И., Бойко В.Р., Григор'єва О.О. та ін. Особливості контролю функціонального стану водоростей за низькотемпературними спектрами фотолюмінесценції // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер: Біологія. Спец. вип.: Гідроекологія. — 2010. — № 3 (44). — С. 72—75.
9. Корнеев Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. — Киев: Альтерпрес, 2002. — 188 с.
10. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 4, № 6. — С. 7—13.
11. Силаева А.М. Структура хлоропластов и факторы среды. — Киев: Наук. думка, 1978. — 204 с.
12. Фатеева Н.А., Матвиенко Г.Г. Лидарное исследование спектров флуоресценции хлорофилла в растениях // Сб. статей молодых ученых II

- Международ. шк. «Физика окружающей среды». — Томск, 2000. — С. 111—113.
13. *Фотосинтез*: В 2 т. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Говинджи. — М.: Мир, 1987. — 728 с.
14. *Vakulenko O., Grygorieva O., Dacenko O.* Degradation of chlorophyll luminescence in plants // *Ukr. J. Phys.* — 2012. — Vol. 57, N 2. — P. 256—259.
15. *Vakulenko O., Grygorieva O., Dacenko O., Zujev V.* Degradation dynamics of low-temperature chlorophyll photoluminescence in plants // *Optics and High Technology Material Science SPO-2010 (October 21—24), Ukraine, Kyiv.* — Kyiv: Scientific Works, 2010. — P. 173.

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

Поступила 18.06.13