

УДК 581.5: 535.33:537.86

**РЕАКЦІЯ РІЗНОВІКОВИХ КУЛЬТУР ВОДРОСТІ *CHLORELLA VULGARIS*
BEIJERINCK НА МІКРОХВИЛЬОВЕ ОПРОМІНЕННЯ**

О. Вакуленко, О. Даценко, О. Григор'єва, М. Березовська

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, Київ 01601, Україна
e-mail: allegro@ukr.net*

У роботі досліджено спектри фотолюмінесценції та динаміку чисельності клітин різновікових культур *Chlorella vulgaris* Beijer. після впливу мікрохвильового випромінювання дециметрового діапазону. Показано, що характер впливу опромінення залежить від вікової групи. На 7-й день експерименту у культури віком 1 тиждень відбувається стимуляція приросту клітин при опроміненні в дозі 45 Дж/г, а у культури віком 6 місяців – стимуляція люмінесценції при опроміненні в дозі 85 Дж/г. За найвищої дози 130 Дж/г у спектрі піврічної культури з'являється додаткова смуга з максимумом приблизно на 695 нм. У культур обох вікових груп опромінення в дозі 130 Дж/г викликало пригнічення розвитку.

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

Нині живі системи постійно переживають тиск різноманітних антропогенних чинників, у зв'язку з чим необхідно досконально вивчити особливості їхнього впливу на організми.

Одним із таких факторів навколишнього середовища є мікрохвильове випромінювання. Відомо, що такий тип радіації по-різному впливає на об'єкти залежно від виду, стадії розвитку і т. ін. [1, 7]. Виявляти впливи зовнішніх чинників на рослини дає змогу оцінка фотолюмінесценції (ФЛ) хлорофілу. Так, концентрація хлорофілу, а відтак і інтенсивність його люмінесценції у рослині є показником її життєздатності [4, 9].

Мета даної роботи – порівняти вплив мікрохвильового випромінювання дециметрового діапазону на стару та молоду культуру зеленої водорості хлорели звичайної. Для контролю за функціональним станом організму ми використовували люмінесцентний метод і динаміку чисельності клітин.

Експерименти були спрямовані на дослідження розвитку культур зеленої водорості *Chlorella vulgaris* Beijer. віком 1 тиждень і 6 місяців. Опроміненню піддавалася суспензія водоростей об'ємом 100 мл, що містилася у скляній посудині. Як джерело мікрохвильового випромінювання використовували магнетрон із частотою генерації $\nu = 2450$ МГц (довжина хвилі $\lambda \approx 12$ см). При експозиціях 10, 20 і 30 с температура піднімалася до 35, 45 та 55°C, а поглинуті дози становили 45, 85 і 130 Дж/г відповідно; контрольні зразки не піддавалися опроміненню.

Функціональний стан досліджуваних біоб'єктів контролювали за ефективністю фотолюмінесценції (ФЛ) хлорофілу. Крім того, ефективним якісним показником функціонального стану є відношення інтенсивностей основних смуг спектра люмінесценції $f = I(\lambda_{II})/I(\lambda_I)$ [11]. Зокрема, його зменшення відповідає погіршенню функціонального стану: вважається, що ФС II найбільш чутлива до зовнішньої дії. Слід, однак, зазначити, що

критерій оцінки стану рослини за значенням f коректний лише для вимірювань при кімнатних температурах, а при температурах рідкого азоту ймовірним є протилежний випадок, коли збільшення значення f супроводжує якраз погіршення стану рослини [2]. Проте в нашому випадку, як буде показано, справджується класичний розгляд.

Люмінесценція збуджувалася випромінюванням аргонного лазера з довжиною хвилі 488 нм і потужністю 19 мВт. Спектри вимірювали при температурі рідкого азоту. Вимірювання проводили на 1-й і 7-й день експерименту. Отримані інтенсивності були нормовані на кількість клітин, щоби усунути ефект впливу росту біомаси на ефективність свічення.

Підрахунок концентрації клітин у зразках проводили на 1-й, 2-й, 5-й і 7-й день експерименту за методикою [8].

У спектрах ФЛ спостерігалися дві основні смуги випромінювання з максимумами на $\lambda_1 = 710 \div 720$ нм і $\lambda_{II} = 685$ нм. По осі ординат відкладена питома інтенсивність, тобто величина, віднесена до кількості клітин у культурі. Відомо [3], що обидві смуги обумовлені хлорофілом a : пік у ділянці $\lambda_{II} = 685$ нм відповідає фотосистемі (ФС) II, тоді як смуга в ділянці $\lambda_1 = 714 \div 726$ нм належить ФС I і є складною.

Було встановлено, що опромінення протягом 10 та 20 с із відповідними дозами 45 і 85 Дж/г загалом не впливає на форму спектрів тижневої культури (рис. 1, криві 2 і 3), помітне лише невелике підвищення загальної інтенсивності ФЛ. Обробка в дозі 130 Дж/г пригнічує функціональний стан культур, оскільки впливає на співвідношення f інтенсивностей у спектрі: внесок короткохвильової смуги зменшився (рис. 1, крива 4). Крім цього, смуга 720 нм змістилася в бік коротких хвиль приблизно на 10 нм і розширилася приблизно на 5 нм.

На 2-гу добу експерименту концентрація клітин в опроміненіх зразках помітно впала порівняно з контрольним зразком (рис. 2), причому зі збільшенням дози опромінення кількість клітин знижувалася монотонно. Проте на 7-й день зразок, опромінений у дозі 85 Дж/г, зрівнявся за кількістю з контрольним, а зразок, опромінений протягом 10 с, навіть

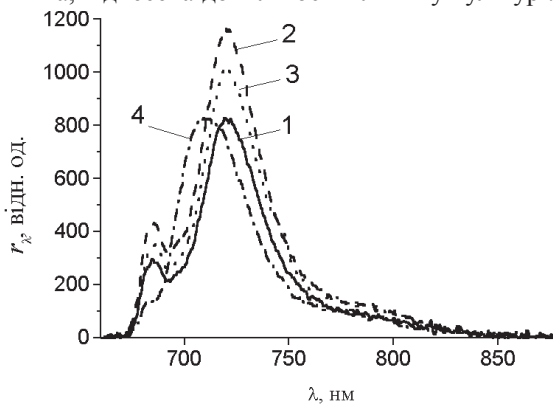


Рис. 1. Спектри ФЛ тижневої культури *Ch. vulgaris* у 1-й день після опромінення мікрохвильовою радіацією: 1 – контроль; 2 – експозиція 10 с (45 Дж/г); 3 – 20 с (85 Дж/г); 4 – 30 с (130 Дж/г).

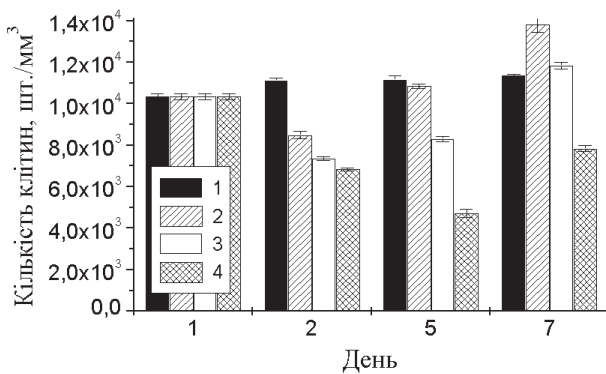


Рис. 2. Динаміка чисельності клітин тижневої культури *Ch. vulgaris* після опромінення мікрохвильовою радіацією: 1 – контроль; 2 – експозиція 10 с (45 Дж/г); 3 – 20 с (85 Дж/г); 4 – 30 с (130 Дж/г).

перевищив його. Після обробки в максимальній дозі протягом усього експерименту кількість клітин у зразку була помітно нижчою, ніж у контролі.

Спектри ФЛ зразків тижневої культури на 7-й день експерименту наведені на рис. 3. Можна бачити, що для доз 45 і 85 Дж/г питомі інтенсивності люмінесценції практично збіглися з інтенсивністю контрольного зразка у межах похибки вимірювання. Отже, на 7-й день експерименту культура за функціональним станом повернулася на рівень необробленого зразка.

Для зразка, опроміненого у найвищій дозі, питома інтенсивність випромінювання була меншою, ніж для контрольного, – це може означати, що функціональний стан культури погіршився. Проте склад спектру не відрізнявся від контрольного та дослідних зразків, опромінених у інших дозах.

Експерименти на піврічних культурах показали, що опромінення в дозах 45 та 85 Дж/г не змінили ні загальної інтенсивності люмінесценції, ні форми спектра (рис. 4). Найтри-

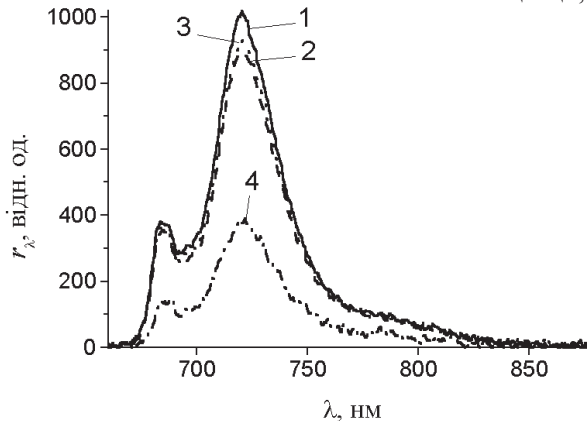


Рис. 3. Спектри ФЛ тижневої культури *Ch. vulgaris* на 7-й день після опромінення мікрохвильовою радіацією: 1 – контроль; 2 – експозиція 10 с (45 Дж/г); 3 – 20 с (85 Дж/г); 4 – 30 с (130 Дж/г).

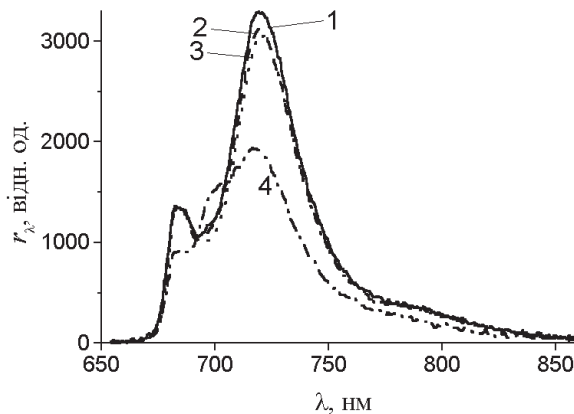


Рис. 4. Спектри ФЛ піврічної культури *Ch. vulgaris* у 1-й день після опромінення мікрохвильовою радіацією: 1 – контроль; 2 – експозиція 10 с (45 Дж/г); 3 – 20 с (85 Дж/г); 4 – 30 с (130 Дж/г).

валіша обробка (доза 130 Дж/г) суттєво зменшила інтенсивність ФЛ, а в спектрі з'явилася додаткова смуга з максимумом приблизно на 695 нм. Ця смуга характеризується у літературі [5] як лінія випромінювання ФС II, а її джерелом, за припущенням, є феофітин. Імовірно, розширення смуги λ_1 у спектрі молодшої культури, обробленої в дозі 130 Дж/г (див. рис. 1, крива 4), і видимий короткохвильовий зсув цієї смуги теж значною мірою обумовлені посиленням смуги 695 нм. Очевидно, вона посилюється через порушення процесів міграції енергії у хлоропласті, через що в результаті випромінює не хлорофіл, а інший пігмент – феофітин.

На 7-й день спектри люмінесценції для варіантів дослідження, оброблених у дозах 45 і 85 Дж/г, були абсолютно ідентичні контрольному, проте інтенсивність люмінесценції оброблених зразків суттєво вища, особливо для дози 85 Дж/г (рис. 6). Концентрація клітин у цих зразках фактично не відрізнялася від концентрації в контрольному зразку (рис. 5).

За час експерименту чисельність клітин у суспензії,

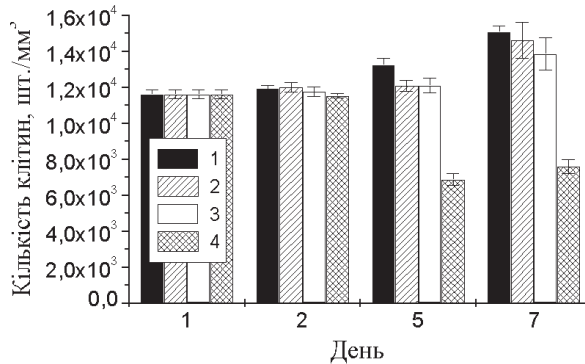


Рис. 5. Динаміка чисельності клітин піврічної культури *Ch. vulgaris* після опромінення мікрохвильовою радіацією: 1 – контроль; 2 – експозиція 10 с (45 Дж/г); 3 – 20 с (85 Дж/г); 4 – 30 с (130 Дж/г).

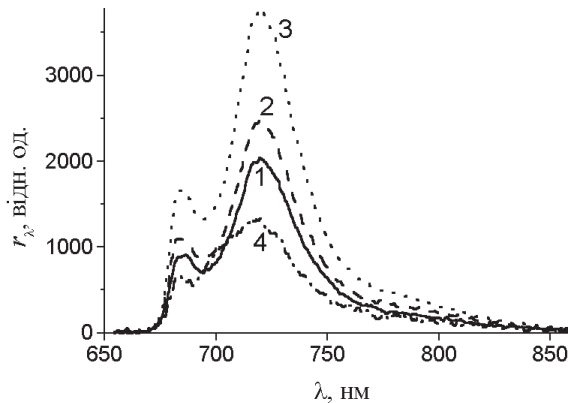


Рис. 6. Спектри ФЛ піврічної культури *Ch. vulgaris* на 7-й день після опромінення мікрохвильовою радіацією: 1 – контроль; 2 – експозиція 10 с (45 Дж/г); 3 – 20 с (85 Дж/г); 4 – 30 с (130 Дж/г).

опроміненій у найвищій дозі, як і питома інтенсивність, суттєво зменшилася, а от значення f залишилося таким самим, як і у контрольній групі. Власне, сам спектр також мало відрізнявся від спектра в 1-й день експерименту: по-перше, лишилися помітними сліди смуги 695 нм, по-друге, максимум спектра був дещо зсунутий у бік коротких хвиль.

Взявши до уваги дані з кількості клітин, можна зробити загальний висновок, що на 7-й день експерименту явне погіршення функціонального стану культури відбувається лише після опромінення в максимальній дозі 130 Дж/г. Обробка в менших дозах або не впливає на стан клітин (піврічна культура), або ж вони швидко відновлюються (тижнева культура) і надалі розвиваються на одному рівні з контролем. Отже, існує певна порогова доза опромінення, після якої нормальний розвиток культури порушується. Про погіршення функціонального стану може свідчити й суттєво нижча ефективність люмінесценції культури, обробленої в найвищій дозі.

Порівняння кількісних і люмінесцентних даних піврічної та тижневої культур допомагає

виявити і певні відмінності в їхньому розвитку внаслідок опромінення дозами, нижчими за порогову. Загалом, можна сказати, що піврічна культура за всіма показниками поводить себе більш «інертно» щодо мікрохвильового опромінення порівняно з тижневою. Так, тижнева культура вже на 1-й день експерименту реагує підвищенням інтенсивності ФЛ при опроміненні в дозах 45 та 85 Дж/г, у піврічної ж подібна стимуляція відбулася на 7-й день. Крім того, у тижневої культури вже на 2-й день відбувся помітний спад кількості клітин у всіх оброблених зразках, хоча згодом спостерігалась і стимуляція при опроміненні в дозі 45 Дж/г. У той же час піврічна культура зберігала у всіх варіантах досліду, окрім оброблених у найвищій дозі, кількість клітин на рівні контрольного. За даними літератури [10], стійкість до теплових факторів у старих рослинних клітин вища. Оскільки побічним ефектом мікрохвильового опромінення є нагрівання, можливо, в даному разі можна вважати таку властивість організмів неспецифічною. Інтенсивніша ФЛ хлорофілу в

оброблених піврічних культурах на 7-й день (рис. 6) може свідчити про більш розвинений фотосинтетичний апарат клітин, тобто про їхній кращий функціональний стан. Таким чином, маємо стимуляцію функціонального стану піврічної культури внаслідок мікрохвильової обробки малими дозами. Після перерахунку інтенсивності люмінесценції оброблених зразків тижневої культури на кількість клітин виявилось, що їхній функціональний стан залишився на рівні контрольного.

Зрозуміло, що тимчасове підвищення інтенсивності люмінесценції тижневої культури одразу після опромінення (див. рис. 1) не можна трактувати як покращення її функціонального стану – хоча б тому, що наступного дня спостерігалось зменшення кількості клітин у суспензії (рис. 2). Існує думка [9], що посилення люмінесценції може бути показником закриття реакційних центрів унаслідок саме погіршення функціонального стану. Як імовірну причину посилення ФЛ у цьому випадку можна запропонувати нейтралізацію центрів гасіння люмінесценції хлорофілу. Такими центрами можуть бути, наприклад, інші пігменти, до яких імовірно є передача збудження від молекул хлорофілу. У процесі подальшого розвитку культура повертається до норми, що впливає й із динаміки зміни чисельності і з кінцевої інтенсивності ФЛ опромінених зразків.

Відмінність характеру впливу опромінення на розвиток і функціональний стан культур різного віку можна спробувати пояснити таким чином. Піврічна культура перебуває у менш сприятливих для розмноження та розвитку умовах. Але при цьому вона, очевидно, є більш стійкою до негативного впливу мікрохвиль, тому за кількістю клітин опромінені зразки не відстають від контролю. Навпаки, опромінення, очевидно, може дати поштовх до розвитку фотосинтетичного апарату в клітинах цієї культури, яка досі перебувала у пригніченому стані.

У тижневої культури клітини інтенсивно розвиваються і розмножуються, а під час розвитку всі процеси дуже вразливі. Відомо, скажімо, що кількість хлоропластів у клітині активно збільшується протягом певного часу під час росту рослинної клітини, а потім цей процес призупиняється [10]. Звісно, мікрохвильове опромінення може негативно вплинути на розвиток, унаслідок чого тимчасово підвищується смертність. Проте оброблена тижнева культура швидко наздоганяє контроль за чисельністю, а після дози в 45 Дж/г навіть переважає. За таких темпів розвитку наслідки опромінення швидко зникають, а інтенсивність ФЛ опроміненої культури не відрізняється від інтенсивності люмінесценції в контролі.

Наприкінці вважаємо за потрібне згадати про короткохвильовий зсув смуги λ_r , який спостерігається у спектрах після опромінення у великих дозах. Його причина може полягати в наступному. Відомо [6], що в реакційному центрі ФС I хлорофіл міститься у вигляді мономера, димера чи тримера. Останній характеризується найбільш довгохвильовою смугою випромінювання. Отже, зміщення відповідної спектральної смуги може бути обумовлене розпадом тримерів чи димерів під впливом мікрохвильової радіації. Такий зсув уже спостерігався нами при подібних дослідженнях [2]. Ми вважаємо, що він може бути додатковим показником погіршення функціонального стану рослин.

Отже, реакція водоростей на мікрохвильове опромінення залежить як від отриманої дози, так і від вікової групи. Опромінення в дозі 130 Дж/г пригнічує функціональний стан обох культур. Менші дози, навпаки, можуть викликати стимуляцію розвитку: у тижневої культури опромінення в дозі 45 Дж/г підвищує чисельність клітин, а у піврічної – опромінення в дозі 85 Дж/г підсилює люмінесцентні показники. За найвищої дози у спектрі піврічної культури з'являється додаткова смуга з максимумом приблизно на 695 нм.

1. *Большаков М. А., Евдокимов Е. В., Миненко О. В., Плеханов Г. Ф.* О влиянии ЭМИ дециметрового диапазона на морфогенез дрозофил // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. № 5. С. 676–680.
2. *Вакуленко О. В., Григор'єва 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.
3. *Веселовский В. А., Веселова Т. В.* Люминесценция растений: Теоретические и практические аспекты. М.: Наука, 1990. 200 с.
4. *Гольд В. М., Гаевский Н. А., Григорьев Ю. С.* и др. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла. Красноярск: КГУ, 1984. 84 с.
5. *Гуляев Б. А., Тетенькин В. Л.* Критерий нативности пигмент-белковых комплексов и особенности их организации *in vivo* // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1983. № 4. С. 536–552.
6. *Каранетян Н. В.* Фотосистема 1 цианобактерий: организация и функции // Успехи биол. химии. 2001. Т. 41. С. 39–76.
7. *Кузнецов С. Г., Путинцев А. Ф.* Особенности воздействия мощных УВЧ импульсов на семена гречихи // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. № 5. С. 686–690.
8. *Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай.* К.: Наук. думка, 1982. 552 с.
9. *Рубин А. Б.* Биофизические методы в экологическом мониторинге // Биология. 2000. С. 7–13.
10. *Силаева А. М.* Структура хлоропластов и факторы среды. К.: Наук. думка, 1978. 204 с.
11. *Фатеева Н. Л.* Дистанционная диагностика состояния растений на основе метода лазерно-индуцированной флуоресценции: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. Новосибирск: Ин-т оптики атмосферы им. ак. В. Е. Зуева СО РАН, 2007. 19 с.

Стаття: надійшла до редакції 02.07.10

прийнята до друку 21.10.10

THE RESPONSE OF *CHLORELLA VULGARIS* BEIJERINCK ALGAE OF DIFFERENT AGE TO MICROWAVE IRRADIATION

O. Vakulenko, O. Dacenko, O. Grygorieva, M. Berezovska

*Taras Shevchenko National University of Kyiv
64, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: allegro@ukr.net*

The luminescence spectra and cell number quantity of *Chlorella vulgaris* Beijer. young and old cultures affected by decimeter range emission are studied. The emission effect character is shown to be dependent of the age group. On the 7th day, the cell number rise stimulation occurs for the 1 week old culture irradiated at 45 J/g dose. For the 6 months old one, the luminescence intensity increase stimulation takes place at 85 J/g dose. An additional band peaked at 695 nm appears in the half-year old culture spectrum at the highest dose of 130 J/g. The irradiation at 130 J/g dose causes oppressing the development for both the ages.

Key words: green algae, photoluminescence, microwave irradiation, cells quantity.

**РЕАКЦИЯ РАЗНОВОЗРАСТНЫХ КУЛЬТУР ВОДОРОСЛИ
CHLORELLA VULGARIS BEIJERINCK НА МИКРОВОЛНОВОЕ ОБЛУЧЕНИЕ****О. Вакуленко, А. Даценко, О. Григор'єва, М. Березовская**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 64, Киев 01601, Украина,
e-mail: allegro@ukr.net*

В работе исследованы спектры фотолюминесценции и динамика численности клеток недельной и полугодичной культур *Chlorella vulgaris* Beijer. после влияния микроволнового облучения дециметрового диапазона. Показано, что характер влияния облучения зависит от возрастной группы. На 7-й день эксперимента у недельной культуры наблюдается стимуляция прироста клеток при облучении в дозе 45 Дж/г, а у полугодичной – стимуляция люминесценции при облучении в дозе 85 Дж/г. При максимальной дозе в спектре полугодичной культуры появляется дополнительная полоса с максимумом около 695 нм. У обеих культур облучение в дозе 130 Дж/г вызвало угнетение развития.

Ключевые слова: зеленые водоросли, фотолюминесценция, микроволновое облучение, численность клеток.