

## ПРИМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ РАСТЕНИЙ ПРИ ВНЕШНЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2012 Е.В.Тимченко, Л.А.Таскина

Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П. Королёва  
(национальный исследовательский университет)

Поступила в редакцию 25.01.2012

В данной статье представлены результаты исследований изменения спектральных характеристик различных типов растений при внешнем воздействии. В качестве контролируемого оптического параметра был использован дифференциальный оптический коэффициент. Методом флуоресцентной конфокальной микроскопии проведен детальный анализ структурных изменений в клетках растения. Микроскопически доказано, что механизм деградации хлорофилла в присутствии внешних факторов связан с изменениями на мембранном уровне и, как следствие, оптических характеристик биологической среды.

Ключевые слова: дифференциальный оптический коэффициент, синтетически поверхностно активные вещества, нитраты, конфокальная флуоресцентная микроскопия, солюбилизация

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Рост антропогенной нагрузки на окружающую среду, связанный с увеличением промышленных и сельскохозяйственных выбросов, таких как синтетически поверхностно активные вещества (СПАВ) и нитраты, оказывают отрицательное влияние на баланс экосистем [1-2]. Существующие методы анализа состояния экосистем, такие как хроматография и полярография [3-5], носят контактный и деструктивный характер, обладая высокой точностью и селективностью исследуемых параметров, имеют ограниченную область применения, связанную с оперативностью и трудоёмкостью измерений.

Известно, что выбросы СПАВ и нитратов, как правило, носят залповый характер с последующим достаточно быстрым их аккумулярованием экосистемами. Вместе с тем конечной целью контроля антропогенной нагрузки является предотвращение их негативного влияния на экосистемы. Следовательно, принципиальным является, прежде всего, контроль состояния экосистем и их изменений под действием внешних антропогенных факторов.

Ввиду способности аккумулялировать различные типы загрязнений растения являются эффективными маркерами состояния экосистем. Накопление антропогенной нагрузки в растениях носит интегрирующий характер, т.е. факти-

чески растения содержат в себе «историю» выбросов загрязнителей. Данные эффекты неизменно приводят к изменению концентрации хлорофилла а и b в растении, что, с одной стороны, меняет его биологический цикл, а с другой – приводит к изменению спектральных свойств среды. Следовательно, контролируя данные спектральные изменения, можно не только судить о количестве загрязнений, но и одновременно оценивать степень их влияния на экосистемы. Данный контроль может быть осуществлён методом дифференциального обратного рассеяния, который обладает высокой чувствительностью и даёт наиболее целостную информацию о состоянии живой системы [6-7].

Для понимания механизмов накопления и воздействия загрязнителей на живые системы крайне важным является анализ изменений в структуре растения на клеточном уровне. Учитывая высокую эффективность флуоресценции хлорофилла, в настоящей работе для микроскопического анализа использован метод конфокальной флуоресцентной микроскопии [8], обеспечивающий контрастные микроснимки высокого разрешения.

Целью работы являлось исследование спектральных характеристик и микроструктуры растений для оценки степени влияния внешних факторов воздействия на экосистемы.

Для реализации целей необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать оптические характеристики водного растения Элодеи бразильской (*Elodea Brazilian*, *Egeria densa*) при действии различной концентрации и типов синтетически поверхностных активных веществ (СПАВ);

*Тимченко Елена Владимировна, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, ассистент кафедры экологии и безопасности жизнедеятельности.*

*E-mail: vorobjeva.82@mail.ru*

*Таскина Лариса Анатольевна, студентка.*

*E-mail: retuo@mail.ru*

2. Исследовать спектральные характеристики высших растений в присутствии сельскохозяйственных выбросов;

3. Установить функциональные зависимости спектральных характеристик растений от концентрации антропогенных выбросов;

4. Провести анализ микроструктурных изменений растений при действии загрязнителей.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования по влиянию различных типов СПАВ на изменение оптического состояния растений был использован пресноводный макрофит Элодея бразильская (*Elodea Brazilian*, *Egeria densa*). Водные растения были разделены на 4 группы. Контрольная группа растений находилась в среде фильтрованной водопроводной воды. Три группы составляли водные растворы общедоступного СПАВ с концентрациями 0,002 %, 0,02 % и 2 %. Данные загрязнители вносились однократно в начале эксперимента, т.е. фактически имитировался однократный залповый выброс загрязнителей с фиксированной их концентрацией. Опыты проводились в лабораторных условиях в резервуарах с водой, исключающих внешние воздействия. Обеспечивались единые климатические условия для всех групп растений, а также регулярность и постоянство светового потока, воздействующего на среду.

Методика проведения экспериментальных исследований по воздействию нитратов на оптические характеристики растений состояла в следующем: каждое из исследуемых высших растений (петрушка, укроп) было разделено на 3

группы: контрольная группа, группа с предельной допустимой концентрацией и группа с удвоенной предельной допустимой концентрацией нитратов в почве. Нитратные удобрения вносились однократно в начале эксперимента.

Экспериментальный стенд, реализующий методы дифференциального обратного рассеяния и конфокальной микроскопии, представлен на рис. 1.

Спектрофотометрическая установка 1а включала в себя источник излучения, волоконную систему сбора и подачи излучения, и спектрофотометр SR-303i (фокальная длина 303 мм) с интегрированной цифровой камерой ANDOR DV-420A-OE (1024\*256, 26 мкм<sup>2</sup>, 16 бит). Экспериментальная установка позволяет работать с излучением в спектральном диапазоне 180 – 1200 нм с погрешностью регистрации 0.2 нм. В качестве источника излучения использовалась галогенная лампа (спектральный диапазон излучения вырезался с помощью фильтров и составлял 400...1000 нм).

Установка флуоресцентной конфокальной микроскопии 1б состояла из источника излучения (галогенная лампа), оптической системы фокусировки, конфокального блока и камеры регистрации (1024\*1024, время экспозиции 40мс).

Эксперименты проводились на протяжении всего жизненного цикла растений с ежедневным многократным контролем оптических характеристик растения и регистрацией микроснимков.

В качестве основного оптического параметра, характеризующего изменение концентрации хлорофилла при действии загрязнителей был использован дифференциальный оптический

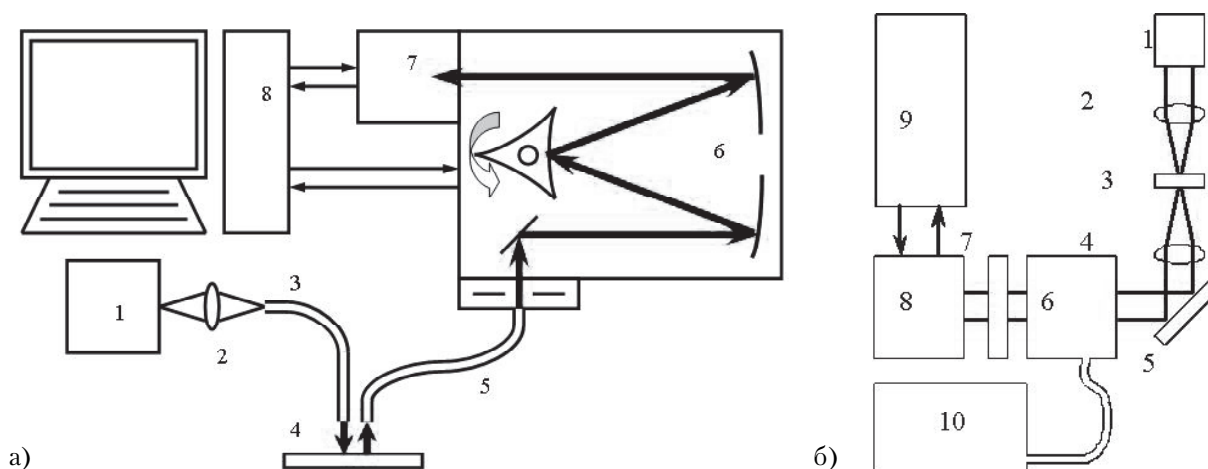


Рис. 1. Экспериментальный стенд:

а) Спектрофотометрическая установка: 1 – источник света (галогенная лампа), 2 – фокусирующая линза, 3 – подающее волокно, 4 – объект исследования, 5 – приемное волокно, 6 – спектрограф SR-303i, 7 – цифровая камера ANDOR DV-420A-OE, 8 – компьютер;

б) Установка флуоресцентной конфокальной микроскопии: 1 – источник видимого света (галогенная лампа), 2 – коллиматор, 3 – объект, 4 – объектив, 5 – поворотное зеркало, 6 – конфокальный сканирующий блок, 7 – блок фильтров, 8 – камера, 9 – компьютер, 10 – лазерный блок

коэффициент ДК, который был ранее применен в работе [7] для контроля атмосферных загрязнителей:

$$\Delta K = \frac{K(t,0) - K(t,C^*)}{K(t,0)}, \quad K = \frac{I_{750}}{I_{550}},$$

где  $C^*$  – концентрация загрязнителей,  $t$  – время,  $I_{750}$  и  $I_{550}$  интенсивности обратного рассеяния на длинах волн 750 нм и 550 нм соответственно.

Дифференциальный оптический коэффициент  $\Delta K$  является отношением экспериментально измеренного оптического коэффициента  $K$  к его значению в условиях отсутствия загрязнителей, т.е. соответствующих естественным условиям. Поскольку длина волны 550 нм соответствует максимуму поглощения хлорофилла, а длина волны 750 нм связана с поглощением клетчатки растения, то дифференциальный коэффициент  $\Delta K$  однозначно отражает динамику изменения оптических характеристик растения вследствие влияния загрязнения среды.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Экспериментальные исследования оптических характеристик растений при действии СПАВ

Динамика дифференциального оптического коэффициента  $K$  для растений (при различных концентрациях СПАВ) представлена на рис. 2.

Видно, что наблюдается спад дифференциального коэффициента вследствие деградации хлорофилла в биоткани. В то время как в контрольной группе растений значение коэффициента остаётся практически неизменным. Первая

группа растений, выращиваемых в среде с очень высокой концентрацией СПАВ (0,2%), к концу эксперимента практически полностью утрачивала пигменты, что отчётливо отражалось на изменении дифференциального оптического коэффициента (рис. 2).

Данные качественные различия удалось понять, проведя микроскопический анализ растений на клеточном уровне с использованием метода конфокальной флуоресцентной микроскопии. Характерные микроснимки (180\*110 мкм) ткани растений различных контрольных групп (10 день) представлены на рис. 3. Реализованная установка конфокальной микроскопии обеспечивает разрешение, достаточное для уверенной регистрации хлорофилла (рис. 3г), что позволяет рассчитать его концентрацию на клеточном уровне (рис. 3д).

Из микроскопического анализа следует, что, в присутствии СПАВ сохраняется равномерность распределения хлорофилла по клетке (рис. 3б), но концентрация его падает с увеличением концентрации в залповом выбросе СПАВ, приводя к полной деградации хлорофилла при достижении концентрации СПАВ порядка десятых долей процента (рис. 3а).

Полученные результаты связаны с тем фактом, что СПАВ сольбилизируют мембраносвязанные белки мембраны клетки, нарушая её свойства [9]. Это способствует проникновению СПАВ во внутриклеточное пространство. Глубина действия настолько велика, что отражается даже на двумембранных органоидах, таких как пластиды. Это способствует высвобождению пигментов из растения, тем самым снижая их концентрацию и приводя к изменению дифференциального оптического коэффициента. По мере увеличения доли СПАВ во внутриклеточ-

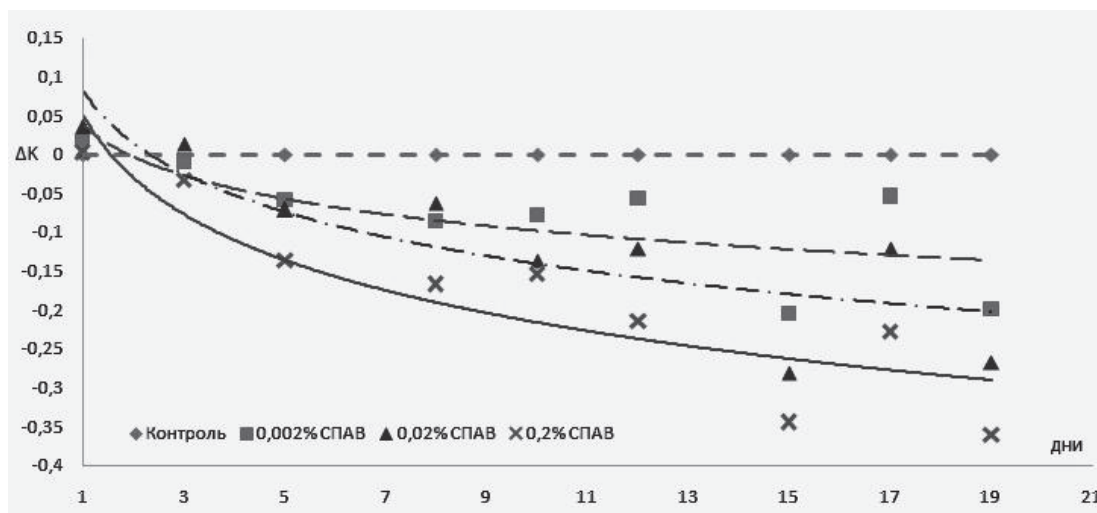
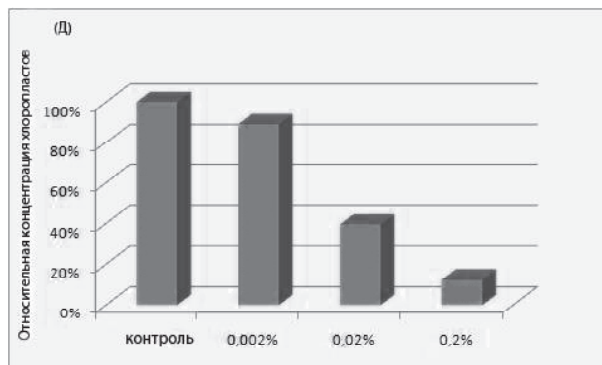
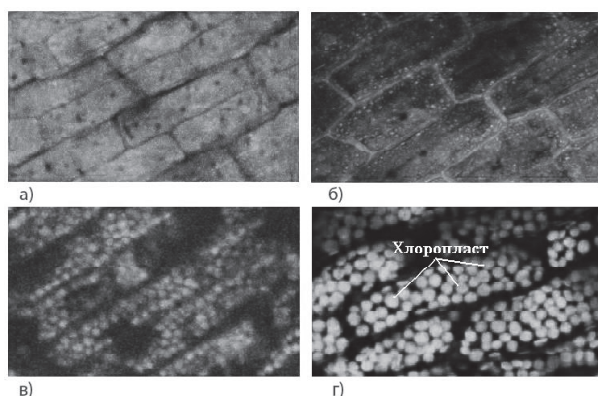


Рис. 2. Зависимость дифференциального оптического коэффициента от времени для Элодеи (*Elodea Brazilian*) при различных концентрациях СПАВ



**Рис. 3.** Микроснимки (370\*370 мкм) ткани водного растения при воздействии СПАВ 0,2% (а), СПАВ 0,02% (б), СПАВ 0,002% (в) и контрольной группы (г); относительная концентрация хлорофилла в группах растений (д)

ном пространстве скорость данного процесса падает вследствие уменьшения хлорофилла, что проявляется в виде эффекта насыщения дифференциального оптического коэффициента.

### 3.2. Исследование изменений оптического состояния растений при действии нитратов

Изменение дифференциального оптического коэффициента  $K$  высших растений при действии сельскохозяйственных выбросов (нитратных удобрений) представлена на рис. 4.

Из графиков видно, что увеличение концентрации нитратов приводит к росту дифференциального оптического коэффициента ДК. Последующий спад  $K$  на 8-ой (для укропа) и на 12-ый (для петрушки) дни проведения экспериментов связаны с уменьшением концентрации хлорофиллов и увеличением концентрации каротиноидов на конечном этапе жизненного цикла растений, что, несомненно, отражается на изменении оптического состояния растений.

Более детальный анализ полученных результатов был проведен с помощью микроскопического анализа растений на клеточном уровне методом конфокальной флуоресцентной микро-

скопии (рис. 5-6).

Из анализа рисунков 5 - 6 следует, что, при действии нитратов наблюдается неравномерность распределения хлоропластов в клетке растений.

Проведенный микроскопический анализ позволил провести оценку изменения размеров хлоропластов для различных растений от времени (рис. 7). В результате были построены зависимости относительного размера хлоропластов от ПДК нитратов, представленные на рис. 7.

Анализ рис. 7 позволяет судить о том, что действие нитратов отражается на изменении мембранной структуры хлоропластов, приводя к увеличению его размеров за счет увеличения концентрации хлорофиллов и росту оптического коэффициента (рис.4).

### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

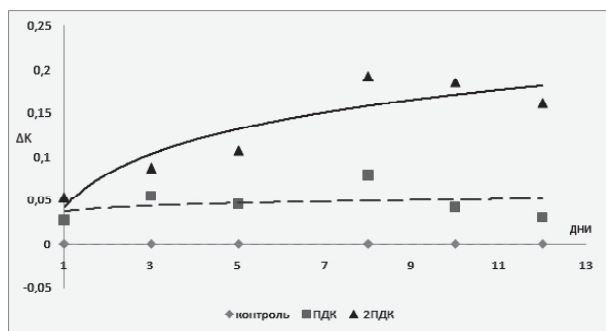
1. В результате проведенных исследований установлены функциональные зависимости оптического коэффициента от концентрации загрязнителей.

2. Микроскопически доказано, что механизм деградации хлорофилла в присутствии СПАВ воздействия связан с солиubilизацией белков мембраны и изменением ее проницаемости.

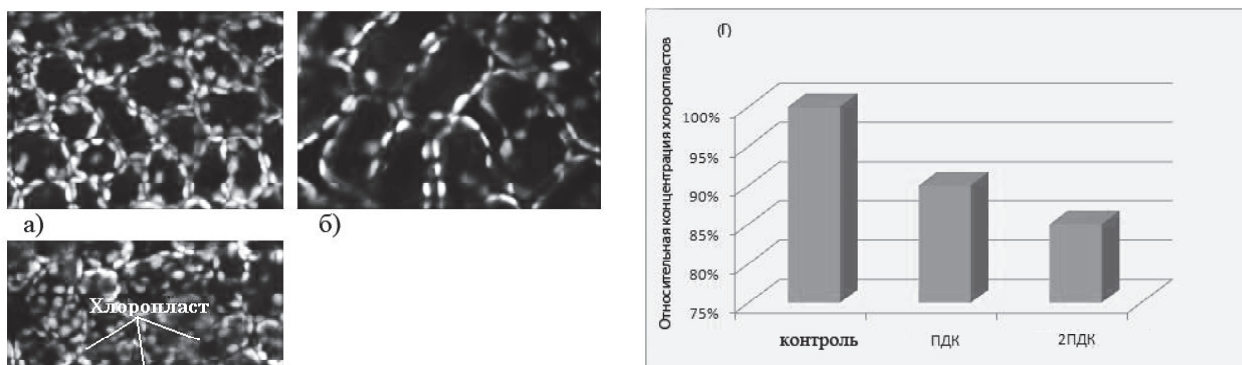
3. Показано, что нитратные удобрения приводят к росту дифференциального коэффициента обратного рассеяния во времени, что микроскопически связано с увеличением концентрации хлорофиллов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

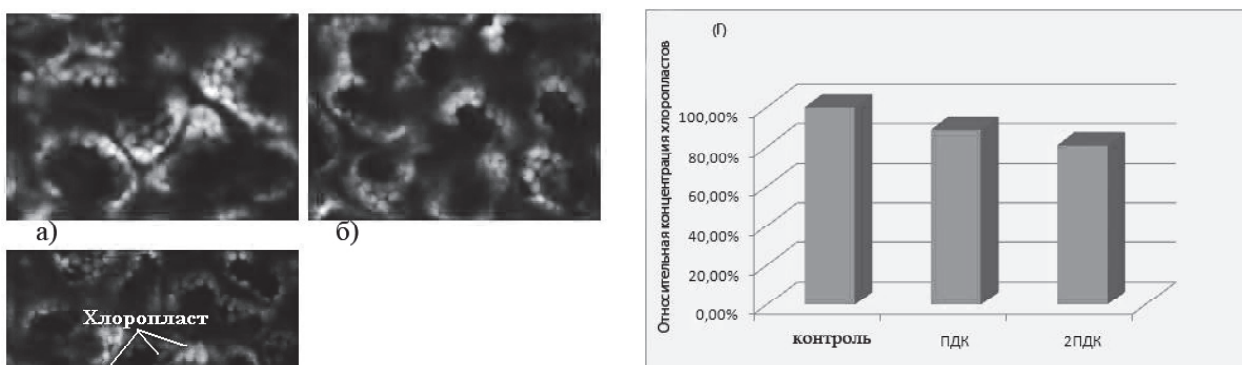
1. Макурина О.Н., Косицына А.А. [и др.] Исследования влияния ионов кадмия и некоторых поверхностно-активных веществ на содержание пигментов в тканях водного растения *EGERIA DENSA* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2009. Т. 11. № 1(4). С. 733-736.
2. Буянова Е.С., Емельянова Ю.В. Оптические мето-



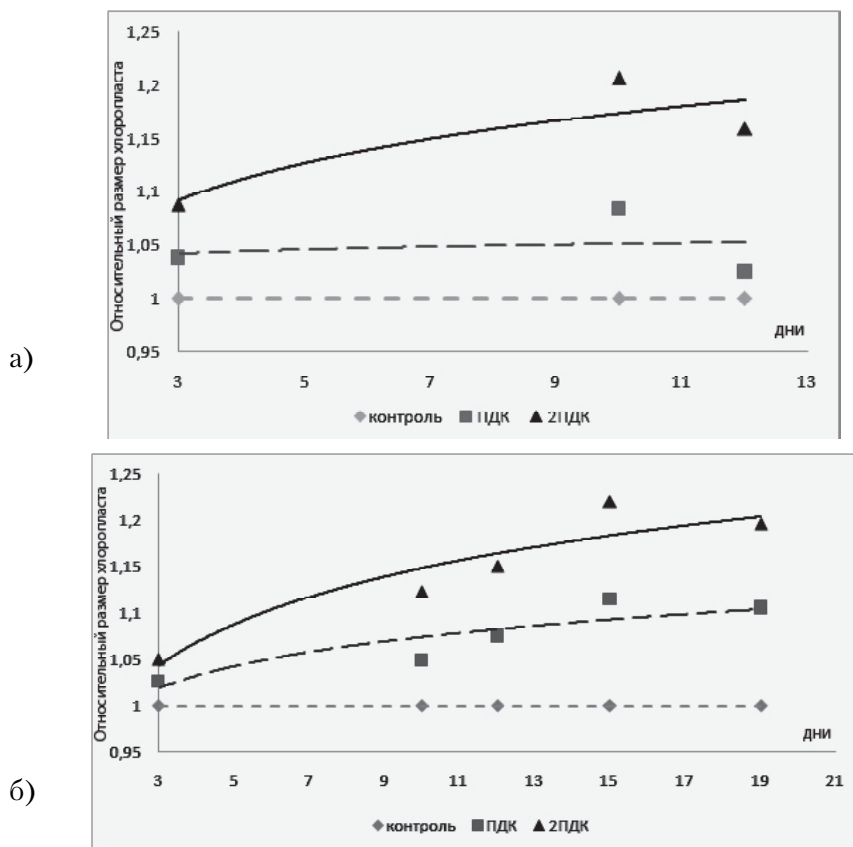
**Рис. 4.** Зависимость дифференциального оптического коэффициента от времени при различных ПДК: а) для укропа (*Anethum*); б) для петрушки (*Petroselinum*)



**Рис. 5.** Микроснимки (370\*370 мкм) ткани укропа при воздействии нитратов с ПДК (а), 2 ПДК (б) и контрольной группы (в); относительная концентрация хлорофилла в группах растений (г)



**Рис. 6.** Микроснимки (370\*370 мкм) ткани петрушки при воздействии нитратов с ПДК (а), 2 ПДК (б) и контрольной группы (в); относительная концентрация хлорофилла в группах растений (г)



**Рис. 7.** Зависимость относительного размера хлоропласта от времени при различном ПДК: а) укропа б) петрушки



- ды анализа объектов окружающей среды и пищевых продуктов. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. 2008. 183 с.
3. Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика. Методы хроматографии и капиллярного электрофореза. М.: Техносфера, 2009. 472 с.
  4. Крюкова Т.А., Синякова С.И., Арефьева Т.В. Полярно-графический анализ М.: Госхимиздат, 1959. 772 с.
  5. Шевченко И.Т., Городынский В.И. Полярнография в медицине и биологии. Киев: Госмедиздат УССР, 1964. 132 с.
  6. Zakharov V.P., Timchenko E.V.[et al.] Optical methods for ecological mapping city territories // Brief messages on physics LPI. 2010. N 7. P. 47-54.
  7. Zakharov V.P., Timchenko E.V.[et al.] Ecological monitoring of megapolis on the basis of differential back-scattering control of the wood culture // Laser Physics. 2009. V. 16, N 6. P. 1366-1372.
  8. Zakharov V.P., Timchenko P.E., Bratchenko I.A. The microscopic control net of explant // The collection of competitive reports VIII All-Russia youth Samara competition conference of scientific works on optics and laser physics. 2010. P. 155-161.
  9. Helenium A., Simons K. Solubilization of membranes by detergents // Biochim Biophys Acta. 1975. V. 415, N 1. P. 29.

## APPLICATION FOR OPTICAL CONTROLLING METHODS OF PLANTS UNDER EXTERNAL INFLUENCE

© 2012 E.V.Timchenko, L.A.Taskina

Samara State Aerospace University named after S.P. Korolyov  
(National Research University)

In this article the experimental study results of spectral characteristic change of different types of plants influenced by external factors are presented. Differential optical factor was used as the monitored optical parameter. A detailed analysis of structural changes in plant cells was conducted with fluorescent confocal microscopy technique. It was microscopically proven that the mechanism of chlorophyll degradation under external factors is related to the changes on the membrane level and, consequently, the optical characteristics of the biological environment.

Key words: differential optical coefficient, synthetic superficially active substances, nitrates, confocal fluorescent microscopy, solubilization