

УДК 535.3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ВОДОРОДА НА ОПТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ

© 2014 Е.В. Тимченко, Е.А. Селезнева, Н.В. Трегуб, Л.А. Таскина, П.Е. Тимченко

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

Поступила 09.01.2014

Проведены экспериментальные исследования влияния водорода на оптические свойства растений с помощью метода комбинационного рассеяния. Выявлено, что при действии водорода на растение увеличивается амплитуда интенсивности комбинационного рассеяния на волновых числах 1130 см^{-1} и 1495 см^{-1} . С помощью метода конфокальной флуоресцентной микроскопии выявлены структурные изменения в листьях растений при действии водорода.

Ключевые слова: Комбинационное рассеяние, конфокальная флуоресцентная микроскопия, водород, оптические характеристики растений, полевые исследования

ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов, осложняющим экологическую обстановку, является дегазация земли – истечение смеси радона, гелия, углеводородов и молекулярного водорода вдоль активных разломов литосферы. При этом наблюдается активизация геологических процессов на ранее стабильных участках Восточно-Европейской платформы [1, 2]. Кроме того, повышенное содержание водорода вблизи несущих металлических конструкций может снижать их прочность в результате охрупчивания [3].

В настоящее время не исследовано влияние действия водорода на живые организмы, и долговременное пребывание растений в атмосфере с повышенной его концентрацией может приводить к самым различным изменениям в их физиологии. Растительные объекты в свою очередь служат маркерами чувствительными к изменению в окружающей среде [4].

Одним из привлекательных методов контроля растительной ткани является оптический мониторинг. К таким методам относятся метод обратного рассеяния [5], комбинационного рассеяния [6] и абсорбционный метод [7]. Более детальная информация об исследуемом объекте может быть получена с помощью флуоресцентного анализа [8], однако данный метод анализа применим только в лабораторных условиях.

Возможным решением изучения воздействия водорода на растения является использование совокупности методов комбинационного рассеяния (КР) и флуоресцентной микроскопии [9], которые позволяют исследовать структурные изменения, происходящие в биотканях на микроскопическом уровне под действием антропогенного стресса.

Поэтому, целью работы являлось исследование влияния водорода на растения с помощью оптических методов контроля.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования

В качестве основных методов исследований были использованы методы спектроскопии комбинационного рассеяния и флуоресцентной конфокальной микроскопии, реализованные с помощью экспериментальных стендов, описанных в работах [9, 10].

В качестве объектов исследований были использованы петрушка обыкновенная (*Petroselinum*) и горох посевной (*Pisum sativum*). Растения были разделены на 3 группы. Две группы растений выращивались в условиях повышенного содержания различной концентрации водорода (1% и 2%). Третья группа растений являлась контрольной. Обеспечивались единые климатические условия для всех групп растений, а также регулярность и постоянство светового потока, воздействующего на среду.

Для обеспечения полноценного доступа воздуха, в нижней части парника в корпусе проделаны вентиляционные отверстия. В корпусе парника на уровне грунта закреплены трубки, через которые подается водород, полученный электролизом воды. Вследствие этого водород поднимается и не выходит в вентиляционные отверстия. На

Тимченко Елена Владимировна, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, доцент, laser-optics.timchenko@mail.ru; Тимченко Павел Евгеньевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, доцент, Timpavel@mail.ru; Селезнева Екатерина Александровна, студентка, 92katty@mail.ru; Трегуб Николай Валерьевич, аспирант, nvtregub@yandex.ru; Таскина Лариса Анатольевна, магистрант; retuo@mail.ru

уровне высоты растений, в парник открывается выводящий патрубок (4), основное назначение которого заключается в контроле концентрации газа на одной высоте и выводе избытка водорода. Состав воздуха, выходящего из патрубка (4) контролировался с помощью анализатора водорода (5).

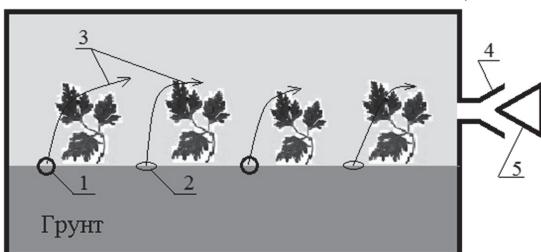


Рис. 1. Схема эксперимента, где: 1 – патрубок подачи водорода; 2 – вводящее вентиляционное отверстие; 3 – восходящий поток; 4 – выводящий патрубок; 5 – газовый анализатор.

При этом, в верхних слоях парника накапливается фактически чистый водород, вытесняя более плотные газы (азот, кислород и др.) вниз. Избыток этих газов выходит через патрубок (4), а не концентрируется в нижней части парника, как могло бы быть при отсутствии вентиляции. В нижней же части через вентиляционные отверстия (2) поступает свежий воздух и водород через отверстия 1. В результате, в средней части, концентрацию водорода можно контролировать, управляя подачей водорода, тем самым поддерживая близкую к заданной концентрацию водорода в области, ограниченной высотами расположения отверстий 1,2 и патрубка 4, что соответствует высоте растений.

Подача водорода в «парник» осуществлялась 3 часа в сутки на протяжении 15 дней (расход водорода подбирался для установления заданных концентраций), после появления отростков высотой 5 см. В дальнейшем время воздействия водорода на образцы было увеличено до 20 часов в сутки: для сравнения реакций при прерывистом воздействии и реакции на воздействие близкое к непрерывному, наблюдающееся в естественной среде. Для

анализа газового состава использовался газовый анализатор водорода фирмы: "Информаналитика" "Хоббит-Т-Н2", имеющий диапазон измерений от 0.02% до 2% от общего объема; и относительную погрешность измерения $\pm 25\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В каждой группе растений отбиралось по 30 листов. Исследования проводились на более 30 листьев растений.

Как видно из рис. 2, амплитуда интенсивности КР на волновых числах 1130 см^{-1} , 1160 см^{-1} , 1495 см^{-1} для растений, выращенных в условиях воздействия 2% концентрации водорода значительно выше, чем для растений, выращенных в условиях меньшей концентрации водорода.

Далее приведена таблица с расшифровкой основных линий КР. Из таблицы видно, что изменение амплитуды пиков на волновых числах 1130 см^{-1} , 1160 см^{-1} , 1495 см^{-1} связаны с изменением концентрационного состава глюкозы, крахмала и каротиноидов.

Таблица 1. Расшифровка спектра КР

$\lambda, \text{ см}^{-1}$	Вещество
730	Хлорофилл а и б, фруктоза [11], [12]
945	CH и CH ₂ [13]
1130	Глюкоза, крахмал [14]
1160	Каротиноиды [11],[12]
1286	CO ₂ [7]
1330	CO ₂ [11]
1495	Каротиноиды [11],[13]
1556	O ₂ [7]
1595	H ₂ O[11],[13]

Изменения амплитуды КР при действии водорода могут быть связаны с выделением CO₂ из почвы в результате ее взаимодействия с водородом и выделения почвенных бактерий. Для исключения данного факта были проведены эксперименты на растении (горох), выращенном гидропонным методом. Результаты данных исследований представлены на рисунке 2.

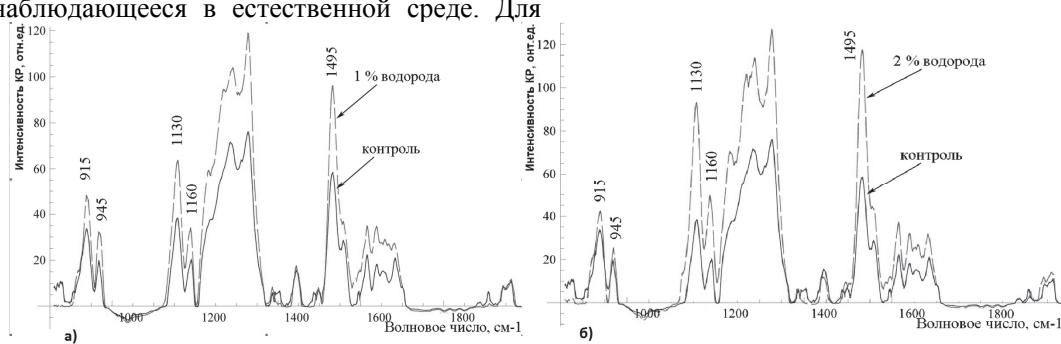


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния контрольного образца петрушки и образца, находящегося в условиях воздействия водорода, где: а) при действии 1% водорода и контрольного образца; б) при действии 2% водорода и контрольного образца.

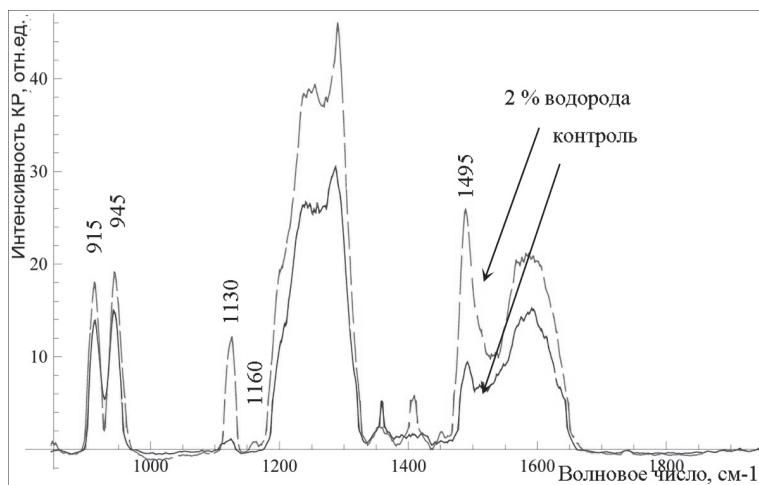


Рис. 3. Зависимость интенсивности КР от волновых чисел для гороха при действии 2% водорода и контрольного образца

Как видно из рис. 3, аналогичные изменения амплитуды КР наблюдаются на волновых числах 1130 см⁻¹ и 1495 см⁻¹ при действии водорода, что и на образцах, выращенных в почве.

Следовательно, данные изменения оптических характеристик растений при действии водорода свидетельствуют об усилении процесса фотосинтеза, что может быть объяснено увеличением концентрации водорода [15].

Среднеквадратическое отклонение данных внутри каждой группы растений в лабораторных экспериментах составило 6%.

ризуется дегазацией глубинных газов (А), второй - нет (Б).

В качестве исследуемого растения, была выбрана земляника (*Fragaria*). Исследования проводились на 10 листьях, отобранных с каждой зоны (рис. 4). Выбор был обусловлен тем, что данный вид растений является достаточно изученным и распространенным на открытых территориях растений, а высота листьев растения находится достаточно близко к земле. Поэтому, объект максимально контактировал с газами в диапазоне высот с наибольшей их концентрацией. Освещенность и тип почвы на исследуемых участках (А и Б) были идентичными.

Результаты полевых исследований

Методика и материалы

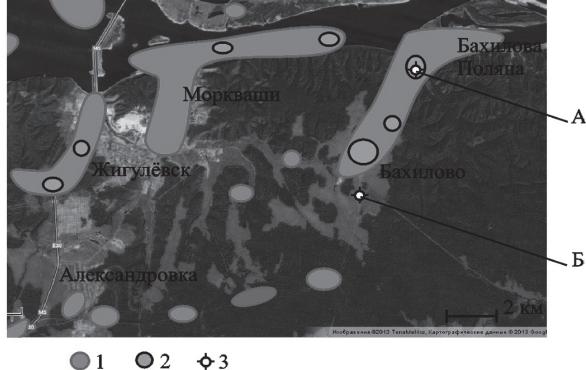


Рис.4. Карта комплексной интерпретации геохимических данных, где: 1 - области выхода газов; 2 - области с наиболее активным газовым режимом; 3 - места сбора образцов

С использованием карты комплексной интерпретации геохимических данных, составленной в Волжском отделении института геологии и разведки горючих ископаемых, представленной на рис.4, были выбраны два участка на территории парка Самарская Лука, один из которых характер-

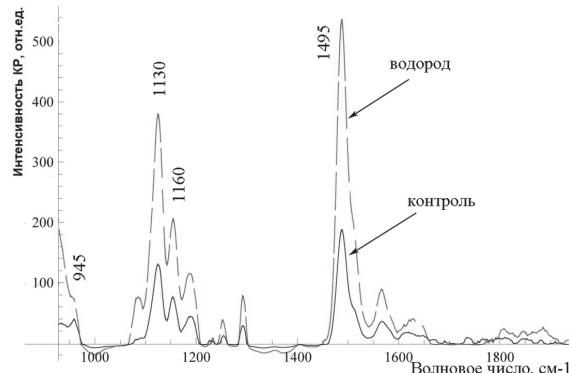


Рис. 5. Результаты полевых исследований изменения спектра КР в результате воздействия водорода

Как видно из рис. 5, на тех же самых волновых числах: 1130 см⁻¹, 1160 см⁻¹, 1495 см⁻¹ наблюдается тенденция возрастания интенсивности. Это подтверждает связь наличия выхода глубинного водорода и увеличения концентрации глюкозы, крахмала и каротиноидов в зоне дегазации земли.

Погрешность измерений для полевых исследований составила 10%.

Для подтверждения полученных результатов исследований был проведен микроскопический анализ структуры листьев, исследуемых образцов с помощью метода конфокальной микроскопии.

Полученные снимки были обработаны с помощью программы ImageJ.

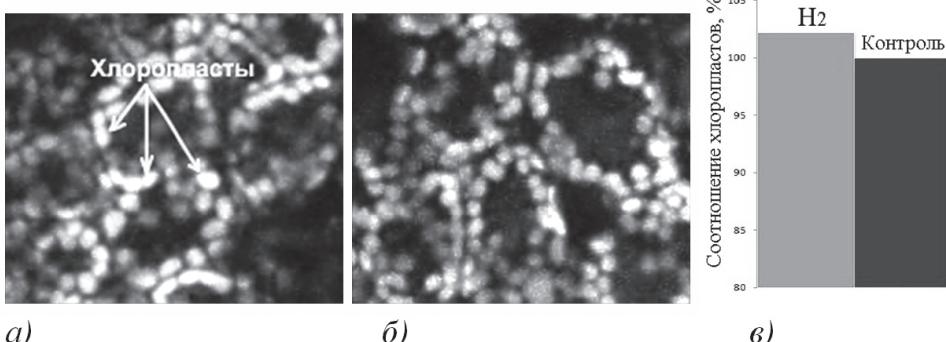


Рис. 6. Микроизображения растения размером 400мкм*400мкм, где: а) при действии водорода; б) контрольного растения; в) гистограмма процентного соотношения хлоропластов

Как видно из рис. 6 количество хлоропластов в контролльном образце меньше, чем в образцах исследований, подверженных действию водорода.

В приведенной выше гистограмме за 100% было принято количество хлоропластов в контролльном образце.

Микроскопически наблюдается увеличение числа хлоропластов в условиях дегазации земли. Таким образом, за счет химических реакций происходит увеличение глюкозы и крахмала в растениях, что в свою очередь отражается на морфогенетических изменениях - увеличении хлоропластов в условиях дегазации земли и приводит к изменениям оптических характеристик растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных экспериментов:

1) Получены особенности спектра комбинационного рассеяния растений при воздействии водорода. Показано, что при концентрации водорода 2% повышается амплитуда интенсивности комбинационного рассеяния на волновых числах 1130 см⁻¹, 1495 см⁻¹ и 1160 см⁻¹, что связано с увеличением глюкозы, крахмала и каротиноидов в результате ускорения химической реакции в цикле Кальвина;

2) С помощью метода конфокальной микроскопии показано увеличение хлоропластов в листьях растений при действии водорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Суханова Н.И., Трофимов С.Я., Полянская Л.М., Ларин Н.В., Ларин В.Н. Изменение гумусного состояния и структуры микробной биомассы в местах водородной экскалации / Почвоведение. // Eurasian Soil Science. 2013. № 2. С. 152–162.
- Сывороткин В.Л. Климатические изменения, аномальная погода и глубинная дегазация // Пространство и Время. 2010. № 1. С. 145-154.
- Шашкова Л.В. Атомные механизмы деформации и разрушения металлов и сплавов в условиях водородного охрупчивания. / Международный научно-
- исследовательский журнал = Research Journal of International Studies. 2013. № 8-1. С. 57-64.
- Тимченко Е.В., Таскина Л.А. Применение оптических методов для контроля растений при внешнем воздействии // Изв. Самар. НЦ РАН. 2012. С. 221-226.
- Merzlyak M.N. Non-destructive optical detection of leaf senescence and fruit ripening / M.N. Merzlyak, A.A. Gitelson, O.B. Chivkunova, V.Y. Rakitin // Physio Plant. 1999. № 106. Р. 135-141.
- Özbalci B., Boyaci I.H. Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks / FOOD CHEMISTRY; №3-4; P. 1444-1452.
- Arsar G. Estimating absorbed photosynthetic radiation and leaf area index from spectral reflectance in wheat / G. Arsar, M. Fuchs, E.T. Kanemasu, J.L. Hatfield // Agron. J. 1984. № 76. Р. 211-220.
- Шульгина Л.А. Индуцированная лазером флуоресценция древесной растительности / Известия высших учебных заведений. Физика (Приложение), 2005. № 6. С. 151-152.
- Захаров В.П., Козлов С.В., Моряков А.А., Тимченко Е.В., Тимченко П.Е., Таскина Л.А. Оптические методы для диагностики меланомы кожи // Известия СНЦ РАН, 2013. Т.15. №4. С. 120-124.
- Timchenko P.E., Timchenko E.V., Zakharov V.P., Volova L.T., Boltovskaya V.V. Tertryan Confocal fluorescence microscopy for viable cell detection in a biocarrier // Pacific Science Review, 2011. Т. 3. № 13. С. 182-185.
- Schulz H., Baranska M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy / Vibrational Spectroscopy, №1. (January 2007). P. 13-25.
- Yang X., Zhang A.Y. Direct molecule-specific glucose detection by Raman spectroscopy based on photonic crystal fiber / Anal Bioanal Chem. 2012 Jan. №402(2). P. 687-691.
- Gausman H.W., Allen W.A. Optical Parameters of Leaves of 30 Plant Species / Plant Physiol. 1973. №52. P. 57-62.
- Gitelson A.A., Merzlyak M.N., Chivkunova O.B. Optical Properties and Nondestructive Estimation of Anthocyanin Content in Plant Leaves / Photochemistry and Photobiology. 2001. №74(1). Р. 38–45.
- Айздаичер Н.А., Маркина Ж.В. Токсическое действие детергентов на водоросль *Plagioselmis prolonga* (Cryphophyta) / Биология моря, 2006. Том 32. № 1. С. 50–54.

EXPERIMENTAL RESEARCHES OF THE INFLUENCE OF HYDROGEN ON OPTICAL CHARACTERISTICS OF PLANTS

© 2014 E.V.Timchenko, E.A.Selezneva, N.V.Tregub, L.A.Taskina, P.E.Timchenko

Samara State Aerospace University
(National Research University), Samara

Experimental studies of the effect of hydrogen on the optical properties of plants using the Raman scattering. Revealed that by the action hydrogen on the plant increases the amplitude of the Raman scattering intensity at wavenumbers 1130 cm⁻¹ and 1495 cm⁻¹. Using the method of confocal fluorescence microscopy revealed structural changes in the plant leaves by the action of hydrogen.

Key words: Raman scattering, confocal fluorescence microscopy, hydrogen, the optical characteristics of plants, field research

Timchenko Elena Vladimirovna, Ph.D. in Physical and Mathematical Sciences, Senior Researcher, Associate Professor of Biotechnical and Laser Systems Department, laser-optics.timchenko@mail.ru; *Timchenko Pavel Evgenovich*, Ph.D. in Physical and Mathematical Sciences, Senior Researcher, Associate Professor of Biotechnical and Laser Systems Department; *Selezneva Ekaterina Aleksandrovna*, student at the Biotechnical and Laser Systems Department, 2katty@mail.ru; *Trehub Nikolay Valerevich*, postgraduate, nvtregub@yandex.ru; *Taskina Larisa Anatolevna*, master student, retuo@mail.ru