



Odbiór bodźców środowiskowych przez glony *Characeae* sygnalizowany za pomocą ultrasłabej luminescencji

Anna Jaśkowska, Andrzej Dudziak, Robert Borc
Politechnika Lubelska

1. Wstęp

Wiele roślin, w tym znaczna część glonów będących pierwszymi producentami w łańcuchu pokarmowym biocenoz wodnych, wykazuje dużą wrażliwość na negatywne czynniki środowiska. Uważa się, że reakcje tych organizmów mogą stanowić kryterium dla oceny stanu środowiska wodnego. Na przykład, zanikanie najdalej schodzących w głąb jezior ramienicowych łąk podwodnych świadczy o przekroczeniu w zbiorniku granicznego stężenia biogenów docierających ze zlewni (i tak w przypadku fosforanów, jak zaobserwowano, wystarczy do tego stężenie fosforu na poziomie 0,02 mg/l [17]). Skutkiem tego niektóre gatunki ramienic są już gatunkami rzadkimi lub zagrożonymi w skali kraju.

Aktualne trendy w nauce powiązane są z rozwijaniem idei zrównoważonego rozwoju jako najlepszej drogi dla zaspakajania potrzeb społeczeństw z jednoczesną ochroną geoeosystemów. Umożliwienie tego wymaga przeprowadzenia rozmaitych analiz. Warto na przykład podjąć badania wybranych zagadnień związanych z antropopresją, również na poziomie jednego gatunku. Wszystkie organizmy żywe wykazują właściwą dla siebie homeostazę. Odzwierciedla ona utrzymywanie trwałości struktury i właściwych funkcji organizmów pomimo stałych lub przypadkowych niewielkich zmian, często o charakterze okresowym, wywołanych endo- bądź egzogenicznie. Zmiany te, choć prowadzą do pewnych zaburzeń homeostazy, mogą być w pełni odwracalne. Jednak silne ponadprogowe bodźce zewnętrzne (szczególnie związane z antropopresją)

mogą również zmieniać stan homeostazy w sposób całkowicie nieodwracalny. Prowadzą w ten sposób do znacznego upośledzenia poszczególnych organizmów, a nawet śmierci całej ich populacji.

Powszechnie znane jest zjawisko bioluminescencji, czyli intensywnego świecenia niektórych obiektów biologicznych, np. robaczków świętojańskich *Lampyridae*. Jest ono z powodzeniem wykorzystywane do oceny stopnia zanieczyszczenia wód [3, 14] i w chwili obecnej *Microtox* jest powszechnie dostępnym i używanym na szeroką skalę biotestem wykorzystującym bakterie bioluminescencyjne [7, 13].

Natomiast mało znanym zjawiskiem towarzyszącym w sposób ciągły procesom zachodzącym w stanie równowagi dynamicznej żywych komórek jest ultrasłaba luminescencja (USL). Jej natężenie jest mniejsze od progu czułości ludzkiego oka, a więc nie jest rejestrowane wzrokowo. Luminescencja ta jest najczęściej skutkiem chemicznego wzbudzenia, a następnie relaksacji promienistej bardzo małej ilości elektronowo wzbudzonych stanów, głównie tlenu singletowego i grup karbonylowych w różnych strukturach i na różnym stopniu uorganizowania komórek żywych. Tworzenie się tych fotonów w układzie biologicznym trwa nieprzerwanie, podobnie jak np. błona komórkowa nieustannie wytwarza różnicę potencjałów. Jeśli organizm funkcjonuje w sposób niezakłócony i zachowuje homeostazę, to emisja fotonów jest quasi-stacjonarna i minimalna, tak jak i różnica potencjałów na błonach komórkowych w tych warunkach utrzymuje się na ustalonych najniższych poziomach. Jeśli zaś następuje zaburzenie homeostazy poprzez czynniki środowiskowe, to znajduje to odzwierciedlenie w zmianach ultrasłabego świecenia [2, 10, 12, 15]. Promieniowanie elektromagnetyczne emitowane poza granice obiektu badanego niesie wiele informacji o nim. Analizując je prowadzi się badania nieinwazyjnie, bez konieczności ingerencji do wnętrza organizmu. Ultrasłaba chemiluminescencja okazała się pomocna w diagnostyce i leczeniu różnych chorób [4, 5, 11], w farmakologii i biologii [5, 23], w biotechnologii [9], a także w technologii żywności [24].

Zjawisko ultrasłabego świecenia organizmów jest jeszcze zupełnie niebrane pod uwagę w badaniach z obszaru ochrony środowiska, chociaż wydaje się ono bardzo ciekawe i obiecujące dla tych potrzeb. Pozwala na pewnego rodzaju zdalne rozpoznawanie zmian funkcjonalnych roślin, w sytuacji degradacji chemicznej ich środowiska, spowodowanej na przykład obecnością metali ciężkich lub środków farmakologicznych.

W ten sposób można też uzyskać bardziej kompleksowe informacje na temat stanu określonego elementu w środowisku.

Zastosowanie zjawiska luminescencji fotosyntetycznej (czyli tzw. opóźnionej po naświetleniu) do przeprowadzania badań *in situ* ekosystemów wodnych jest już w centrum uwagi badaczy [1,6,18]. Być może w niedalekiej przyszłości uda się dołączyć zminiaturyzowany zestaw ze specjalną komorą przepływową rejestrujący USL mikroorganizmów wodnych do zautomatyzowanej sieci układu monitorującego stan środowiska wodnego, tzw. „Nomos” (*Networked Aquatic Microbial Observing System*) [21] lub „LakeNet” [19].

W pracy podjęto unikatowe badania zjawiska ultrasłabej luminescencji ramienic żyjących w jeziorach i będących od wielu lat materiałem modelowym w badaniach błonowych. Rośliny te osiedlają się w wodach pozbawionych zanieczyszczeń, zatem stanowią dobry jakościowy wskaźnik czystości wód przydatny w diagnostyce stanu środowiska.

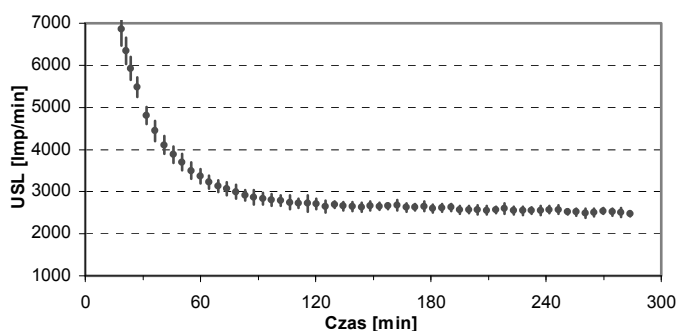
Przedmiotem badań była zarówno spontaniczna ultrasłaba emisja świetlna komórek roślin *Characeae*, jak i indukowana obecnością w środowisku pewnych substancji mających specyficzny mechanizm działania, zwłaszcza w odniesieniu do błony komórkowej roślin. Prezentowane tu przykładowo substancje to: sacharoza wywołująca stres osmotyczny, kwas askorbinowy będący zmiataczem wolnych rodników i octan ołowiu indukujący peroksydację lipidów stanowiącą główny przejaw stresu oksydacyjnego [25]

2. Materiały i metody

Rośliny *Nitellopsis obtusa* (Desv. in Lois) J. Gr. pobrane z jeziora Zagłębocze (Pojezierze Łęczyńsko-Włodawskie, województwo lubelskie) były hodowane w warunkach laboratoryjnych w akwariach z wodą jeziorną przy naturalnym cyklu oświetleniowym dzień/noc w temperaturze pokojowej (16–20°C). Przed eksperymentem komórki międzywęzłowe były przepłukiwane i przetrzymywane przez około 1h w roztworze z antybiotykami (10 µg/cm³ streptomycyny i 20 µg/cm³ penicyliny G) [8], w celu pozbycia się ewentualnych bakterii zalegających ścianki. Próbkę zawierającą 30 komórek umieszczano w naczyniach pomiarowych z roztworem wodnym APW (Artificial Pond Water) o składzie: 0,1 mM KCl; 0,1 mM NaCl; 0,1 mM CaCl₂. Roztwór buforowany był

przez Hepes (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy) o stężeniu 20 mM, w celu utrzymywania stałej wartości pH, którą ustalano na poziomie 7,4–7,5 za pomocą 10% NaOH.

Przed pomiarami komórki przetrzymywano przez 12 h w światłoszczelnej komorze aparatury by wyświeciły luminescencję opóźnioną i można było rejestrować quasi-stacjonarną ultrasłabą emisję fotonową (rys. 1). W trakcie pomiarów do roztworów APW z badanym materiałem wstrzykiwano w odpowiedniej ilości i w warunkach zaciemnienia wybrane reagenty.



Rys. 1. Zanik emisji fotonowej roślin *Characeae* po ich umieszczeniu w światłoszczelnej komorze

Fig. 1. Photon emission decline of *Characeae* algae after placing it in a light-tight chamber

Kwas askorbinowy i Hepes zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Poznań, Polska), inne odczynniki – w POCh (Gliwice, Polska).

Intensywność ultrasłabej emisji w zakresie 340–700 nm była mierzona metodą zliczania pojedynczych fotonów (SPC – Single Photon Counting) za pomocą wysoce czułego, chłodzonego fotopowielacza (EMI 9558A) o bardzo niskim „prądzie ciemnym”. Impulsy z fotopowielacza były kształtowane i wzmacniane, oraz rejestrowane za pomocą komputera. Na wykresach przedstawiano natężenie względne emisji, przyjmując średnią wartość natężenia USL przed dodaniem reagenta za równą 1.

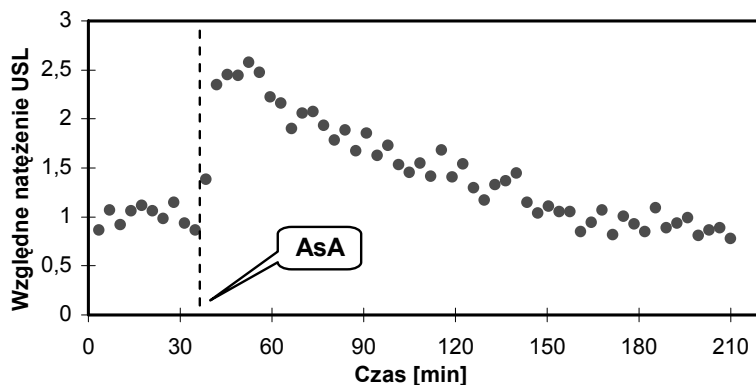
Obrazowanie luminescencyjne w technice zliczania pojedynczych fotonów (Single Photon Counting Imaging – SPCI) uzyskano za pomocą urządzenia Molecular Light Image – „Night Owl” LB 981 wyposażonego

w ultraczułą chłodzoną kamerę CCD o rozdzielczości 512x494 pikseli. Mierzony zakres widmowy mieścił się w przedziale 200–1100 nm.

Prędkość ruchu cytoplazmy oraz ewentualną plazmolizę komórek określano metodą obserwacji mikroskopowych z wykorzystaniem kamery CCD.

3. Wyniki i dyskusja

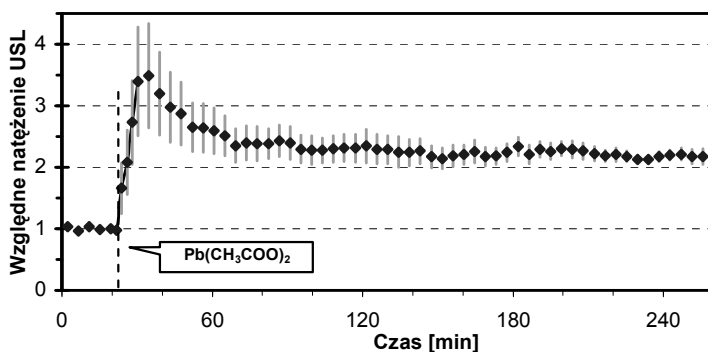
Na podstawie przeprowadzonych badań przedstawiony zostanie wpływ trzech różnych bioczynników na intensywność ultrasłabej luminescencji glonów *Nitellopsis obtusa* z rodziny *Characeae*. Gdy do środowiska badanych roślin wprowadzono kwas askorbinowy (AsA) o stężeniu 5 mM, wówczas natężenie USL niemal natychmiast wzrosło osiągając maksimum po około 15 minutach, by następnie w ciągu 2h powrócić do wartości bliskiej początkowej (rys. 2). Również przy ekspozycji roślin na AsA o stężeniach 0,05–10 mM obserwowaliśmy powrót natężenia USL do poziomu sprzed podania reagentu [12].



Rys. 2. Kinetyka ultrasłabej luminescencji komórek *Nitellopsis obtusa* przed i po ich ekspozycji na działanie AsA (5 mM) – przebieg przykładowy
Fig. 2. Changes of UWL intensity of *Nitellopsis obtusa* cells after exposure to ascorbic acid (5 mM)

Po zakończeniu pomiarów rośliny wykazywały turgor, a ruch cytoplazmy, który ulegał wzmożeniu w czasie korespondującym z czasem zmian USL, powracał do swojej wartości wyjściowej.

Kolejnym użytym związkiem jest rozpuszczalny w wodzie octan ołowiu – $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Związki ołowiu, bardzo szkodliwe dla organizmów żywych, mają tendencję do akumulowania się w środowisku naturalnym, a w szczególności w makrofitach wodnych i osadach dennych jezior i ujść rzek [16]. Pod wpływem obecności octanu ołowiu w środowisku, komórki *Nitellopsis obtusa* szybko reagowały wzrostem USL (rys. 3). Po 10 minutach poziom natężenia luminescencji przekraczał 3,5-krotnie wartość początkową, by po kolejnej godzinie zmniejszyć się do quasistacjonarnej wartości 2,2 razy większej od początkowej. Po pomiarach rośliny wykazywały turgor, w komórkach nie obserwowano śladów plazmolizy, jednak ruch cytoplazmy nigdy nie powracał w nich do stanu początkowego. Ruch cyrkulacyjny cytoplazmy w długich komórkach i roślinach *Characeae* spełnia rolę wysoce efektywnego mechanizmu transportu wewnątrz- i międzykomórkowego. Po ekspozycji na działanie octanu ołowiu nie obserwowano takiego ruchu, lecz czasami lokalnie poruszające się cząstki – ziarnistości cytoplazmy. Może to świadczyć o dysfunkcyjnym wpływie tego związku na molekularny mechanizm napędzający strumień cytoplazmy.

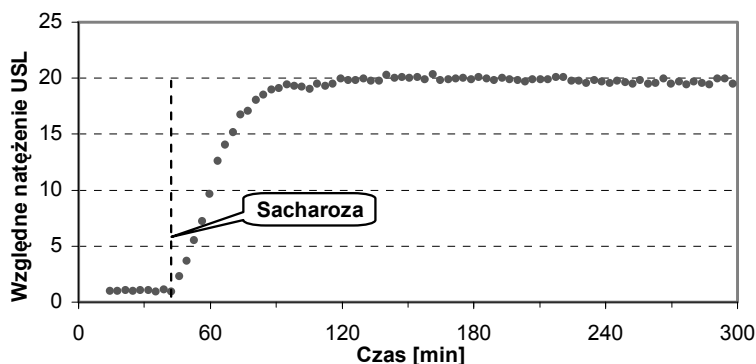


Rys. 3. Zależność natężenia USL od czasu dla komórek *Nitellopsis obtusa* ekspozowanych na działanie octanu ołowiu (10 mM). Średnia z 6 serii pomiarowych

Fig. 3. Changes of UWL intensity after exposure of *Nitellopsis obtusa* cells to lead acetate (10 mM). Average values of 6 series

W przypadku poddania roślin działaniu sacharozy powodującej ucieczkę wody z komórki do otoczenia, następuje w nich stres osmotyczny. W obserwacjach mikroskopowych stwierdzono destrukcję komórek

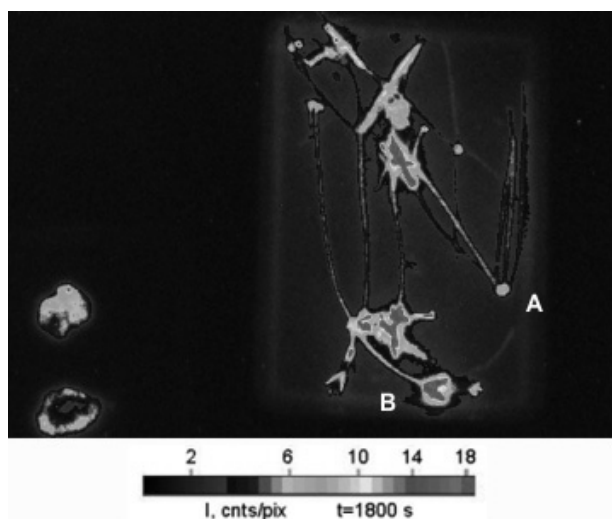
objawiającą się całkowitym brakiem ruchu cytoplazmy oraz plazmolizą. Natomiast w badaniach luminescencyjnych miał miejsce gwałtowny wzrost natężenia USL, który rozpoczynał się natychmiast po podaniu stresora i osiągał swoje maksimum (20-krotny wzrost) po czasie około 1 h (rys. 4). Ten poziom emisji utrzymywał się do końca pomiarów, czyli przez następne cztery godziny obserwacji.



Rys. 4. Zależność natężenia USL od czasu po ekspozycji komórek *Nitellopsis obtusa* na sacharozę (1M) – przebieg przykładowy

Fig. 4. Changes of UWL intensity after exposure of *Nitellopsis obtusa* cells to sucrose (1M)

Innym typem stresu jest zranienie organizmu roślinnego zwane stresem mechanicznym. Wówczas lokalne uszkodzenie fragmentu rośliny nie skutkuje śmiercią całego organizmu. Przykładowe „zdjęcie” (po zastosowaniu pseudokoloryzacji) komórek *Nitellopsis obtusa* po obcięciu tzw. nibyliści wyrastających z węzła komórki pokazano na rysunku 5. Jak widać w obrazowaniu luminescencyjnym wykonanym metodą SPCI, można dokładnie zlokalizować w płaszczyźnie (xy) interesujące nas obszary np. zranienia komórek. Natężenie emisji z obszarów, gdzie znajdują się węzły z obciętymi nibylistkami (B) znacznie przewyższa emisję promieniowania z węzłów nienaruszonych (A). Ten naddatek promieniowania może wynikać z procesów oksydacyjnych lipidów błon komórkowych jako skutek uszkodzenia materii żywej. W miejscach zranień mogą być także uruchamiane procesy naprawcze polegające między innymi na pieczętowaniu plasmodesm w komórkach węzłowych. Warto też podkreślić, że niezależnie od uszkodzeń występują różnice w intensywności luminescencji, gdyż węzły świecą mocniej niż komórki międzywęzłowe.



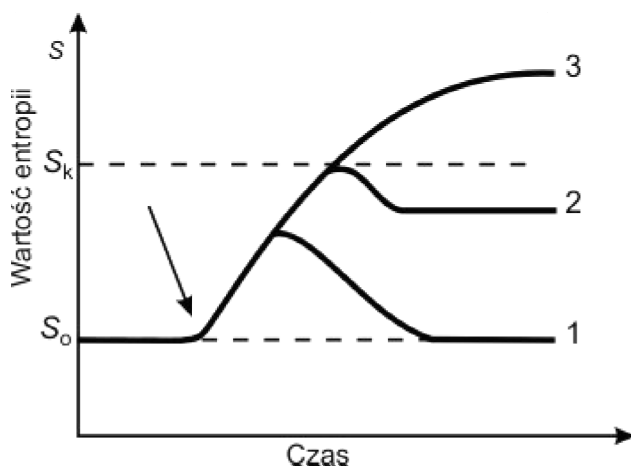
Rys. 5. „Zdjęcie” komórek *Nitellopsis obtusa* po uszkodzeniu mechanicznym uzyskane techniką obrazowania luminescencyjnego. Na rysunku zaznaczono przykładowo węzeł nienaruszony (A) i węzły uszkodzone (B)

Fig. 5. A "photograph" of mechanically damaged *Nitellopsis obtusa* cells obtained by luminescence imaging technique. An example intact node (A) and injured nodes (B) have been marked

Przedstawione na rysunkach 2, 3 i 4 kinetyki USL po ekspozycji roślin na działanie różnych reagentów mieszczą się w schemacie zachowań komórek po zadziałaniu na nie bodźca stresującego, przedstawionym na wykresie Trumpa i Arstily [22] (rys. 6). Schemat ten pokazuje modelowe zmiany entropii w funkcji czasu dla zranionej komórki. Gdy bodziec przekroczy wartość progową to każda komórka odpowiada poprzez stres, czyli zaburzenie homeostazy, generując spontanicznie reakcję mającą na celu skasowanie zaburzenia wywołanego przez bodziec. Ten proces zużywa energię swobodną ΔG , której źródłem są reakcje kataboliczne często związane z generowaniem fotonów. Szczegółowe zależności pomiędzy zaburzeniem homeostazy, wartościami entropii a emisją fotonów przez komórki analizuje Sławiński i inni [20].

Krzywa 1 na rysunku 6 prezentuje poziom entropii, charakteryzujący komórkę w procesie odwracalnym, co odpowiada komórkom, które nie uległy uszkodzeniu po ich ekspozycji na działanie reagenta. Do krzywej tej podobny jest przebieg USL z rysunku 2, gdy komórki pod

wpływem AsA nie wykazywały oznak destrukcji. Możliwe, że jest to związane z antyoksydacyjnymi właściwościami kwasu askorbinowego, dzięki którym komórki po zaburzeniu ich homeostazy wracały do stanu pierwotnego. Krzywa 2 przedstawia poziom entropii w sytuacji powstania nowego, ustabilizowanego stanu po zadziałaniu czynnika uszkodzającego. Jest to adekwatne do zmian USL na rysunku 3, gdy pod wpływem octanu ołowiu następowało częściowe uszkodzenie funkcji życiowych badanych komórek. Wreszcie trzecia grupa komórek jest reprezentowana przez krzywą 3 przedstawiającą poziom entropii przy nieodwracalnych zmianach letalnych. Z krzywą tą koreluje przebieg USL z komórek pod wpływem sacharozy (rys. 4), gdy po zakończeniu eksperymentu nie wykazywały one oznak życia. Widocznie w tym przypadku musiała zostać przekroczona krytyczna wartość entropii (S_k) określająca tzw. punkt bez powrotu.



Rys. 6. Zmiany entropii komórki po jej uszkodzeniu w funkcji czasu: 1 – procesy odwracalne, 2 – procesy subletalne, 3 – procesy letalne, S_0 – entropia nienaruszonej komórki, S_k – krytyczna wartość entropii, określająca tzw. punkt bez powrotu. Strzałka pokazuje początek działania czynnika stresującego

Fig. 6. Changes in entropy of the cells after the damage: 1 – reversible processes, 2 – sublethal processes, 3 – lethal processes. S_0 – entropy of intact cells, S_k – critical value of the entropy, so-called *point of no return*. The arrow shows the onset of the stress factor

4. Podsumowanie

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że badane czynniki w stosowanych stężeniach działały z różną siłą zaburzając homeostazę w różnym stopniu – przejściowo lub trwale. Metoda detekcji ultrasłabej emisji fotonowej jest nieinwazyjna oraz czuła na zmiany zachodzące na poziomie molekularnym w komórce, które są manifestowane emisją większej lub mniejszej puli fotonów. Co więcej, za pomocą obrazowania luminescencyjnego można precyzyjnie lokalizować uszkodzenia w materii żywej, a także, co nie jest ujęte w niniejszej pracy, śledzić czasowo-przestrzenne zmiany emisji świetlnej odzwierciedlające na przykład procesy degradacyjne lub reparacyjne. Zaproponowana metoda może służyć określeniu niekorzystnych zmian w ekosystemach wodnych zachodzących pod wpływem zanieczyszczeń, zatem metodę można stosować jako test ekotoksyczności.

Badania warto rozszerzyć o inne specyficzne reagenty pojawiające się w środowiskach wodnych na skutek ich zanieczyszczenia, jak również powiększyć bazę materiału badawczego.

Podziękowania

Dziękujemy prof. J. Sławińskiemu i dr Z. Górskiemu z Politechniki Poznańskiej za umożliwienie wykorzystania urządzenia „Night Owl” LB 981 dla uzyskania obrazu uszkodzonych komórek (rys. 5)

Literatura

1. **Beardall J., Young E., Roberts S.:** *Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation.* Aquat. Sci., 63, 44–69 (2001).
2. **Borc R., Dudziak A., Jaśkowska A.:** *Ultraweak luminescence of the Characeae plants under the circumstances of cyclical changes in temperature.* Cur. Top. Biophys., 34, 37–44 (2011).
3. **Bulich A.A.:** *Use of luminescence bacteria for determining toxicity in aquatic environments.* W: Aquatic Toxicology. (Markings L.L., Kimerle R.A., eds.) ASTM SHTP 667. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 98–106 (1979).
4. **Cohen S., Popp F.A.:** *Biophoton emission of the human body.* J. Photochem. Photobiol. B, 40, 187–189 (1997).

5. **Deby-Dupont G., Deby C., Mouithys-Mickalad A., Hoebeke M., Mathy-Hartert M., Jadoul L., Vandenberghe A., Lamy M.:** *The antibiotic cef-tazidime is a singlet oxygen quencher as demonstrated by ultra-weak chemiluminescence and by inhibition of AAP consumption.* Biochim. Biophys. Acta, 1379, 61–68 (1998).
6. **Floryszak-Wieczorek J., Górski Z., Arasimowicz-Jelonek M.:** *Functional imaging of biophoton responses of plants to fungal infection.* Eur. J. Plant Pathol., 130, 249–258 (2011).
7. **Fulladosa E., Murat J-C., Bollinger J-C., Villaescusa I.:** *Adverse effects of organic arsenical compounds towards Vibrio fischeri bacteria.* Sci. Total Environ., 377, 207–213 (2007).
8. **Gędziorowska D.:** *Izolacja bałtyckich glonów jednokomórkowych i użyskanie kultur aksenicznych dla badań fizjologiczno-biochemicznych.* W: *Studia i Materiały Oceanologiczne*, PAN, 41, 222–226 (1983).
9. **Godlewski M., Gogol P., Kwiecińska T., Laszczka A., Szczęśniak-Fabiańczyk B., Wierzuchowska D.:** *Zastosowanie pomiaru emisji fotonów do oceny wartości biologicznej nasienia.* Biotechnologia, 1, 116–128 (2003).
10. **Inagaki H., Imaizumi T., Wang G., Tominaga T., Kato K., Iyozumi H., Nukui H.:** *Spontaneous ultraweak photon emission from rice (Oryza sativa L.) and paddy weeds treated with a sulfonylurea herbicide.* Pestic. Biochem. Physiol., 89, 158–162 (2007).
11. **Itoh Y., Amano T., Shimizu T., Hashimoto J., Kubo A., Fukuuchi Y.:** *Single-photon emission computed tomography image of benzodiazepine receptors in a patient with Creutzfeldt-Jacob disease.* Intern. Med., 37, 896–100 (1998).
12. **Jaśkowska A., Borc R., Milczarek I., Dudziak A., Śpiewła E.:** *Kinetics studies of ultraweak luminescence induced by ascorbic acid in Characeae cells and their structures.* Luminescence, 16, 51–56 (2001).
13. **Juliastuti S.R., Baeyens J., Creemers C.:** *Inhibition of nitrification by heavy metals and organic compounds: the ISO 9509 test.* Environ. Eng. Sci., 20, 79–90 (2003).
14. **Mantis I., Voutsas D., Samara C.:** *Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods.* Ecotoxicol. Environ. Saf., 62, 397–407 (2005).
15. **Murkowski A., Skórska E.:** *Comparison of phytotoxicity of lead and tin organic compounds by means of luminescence methods.* Acta Agrophys. 11, 131–140 (2008).
16. **Pawłowski L.:** *Sustainability and Global Role of Heavy Metals.* Problems of Sustainable Development, 6, 59–64 (2011).

17. **Piotrowicz R.:** *Twardowodne oligo- i mezotroficzne zbiorniki z podwodnymi łąkami ramienic Charatea*. W: Poradniki ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny, (Herbich J. red.) Ministerstwo Środowiska, 2, 46–56 (2004).
18. **Prokowski Z.:** *Nowe sposoby pomiaru parametrów luminescencyjnych glonów jako wskaźników zmian w środowisku*. Rozprawa habilitacyjna. Wyd. Akademii Rolniczej, Szczecin. 2002.
19. **Seders L.A., Shea C.A., Lemmon M.D., Maurice P.A., Talley J.W.:** *LakeNet: an integrated sensor network for environmental sensing in lakes*. Environ. Eng. Sci., 24, 183–191 (2007).
20. **Sławiński J., Ezzahir A., Godlewski M., Kwiecińska T., Rajfur Z., Sitko D., Wierzuchowska D.:** *Stress-induced photon emission from perturbed organisms*. Experientia, 48, 1041–1058 (1992).
21. **Sukhatme G.S., Dhariwal A., Zhang B., Oberg C., Stauffer B., Caron D.A.:** *Design and development of a wireless robotic networked aquatic microbial observing system*. Environ. Eng. Sci., 24, 205–215 (2007).
22. **Trump B.F., Arstila A.U.W.:** *Principles of pathobiology*. (La Via M.F., Hill R.B., eds.), Oxford University Press, London. 1971.
23. **Tudisco S., Musumeci F., Scordino A., Privitera G.:** *Advanced research equipment for fast ultraweak luminescence analysis*. Rev. Sci. Instrum., 74, 4485–4490 (2003).
24. **Wang Y-y., Wang J-g., Ma Y-q., Su Z., Zhao K-j., Zhang Z-l., Zheng Y-y., Liu Ch-x.:** *Kinetics of low level chemiluminescence from plant leaf smoked by air pollutants*. J. Environ. Sci., 10, 43–48 (1998).
25. **Zacchini M., Rea E., Tullio M., de Agazio M.:** *Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment*. Plant Physiol. Biochem., 41, 49–54 (2003).

Reception of Environmental Stimuli by *Characeae* Algae Manifested by Ultraweak Luminescence

Abstract

Protecting the environment requires ensuring such conditions that organisms living in it did not suffer permanent damage to their structures and life functions. This also applies to algae living in the aquatic environment. Some species of water flora especially quickly react to negative stimuli arriving from the environment. Their reactions to experienced stress may be a subtle criterion for assessing the condition of aquatic environment. To this kind of plants belong *Chara*, which are bioindicators of water quality. Their response to applied envi-

ronmental stimuli is rapid changes of the electrical parameters of the cell membrane. Our research shows that there is also a change in the intensity of ultraweak luminescence (UWL) generated by these plants. UWL is a phenomenon that continuously accompanies processes occurring in living cells and its intensity is less than the threshold sensitivity of the human eye. The method of measurement of this little known way of *Chara*'s response to environmental stimuli has the advantage that it is completely non-invasive for the test material. Non-invasiveness is due to the fact that the radiation emitted from the samples is measured outside the cell membrane separating the living matter from the surrounding environment.

In our study, after exposure to a selected stimulus, three types of responses of plant cells were observed: 1) – after a temporary increase of UWL, there is a return to the level of light corresponding to undisturbed homeostasis (e.g. when ascorbic acid is added to the environment); 2) – after a temporary increase in the UWL, the emission of photons slightly falls and stabilizes at a new higher level of illumination (when the stress stimulus is e.g. lead acetate, the emission intensity is 2.2 times larger than in the beginning); 3) – after a sudden and significant increase of UWL, the high emission level is maintained for many hours (e.g. after adding sucrose follows a 20-fold increase of UWL).

UWL curves obtained in our experiments correlate with the changes of entropy corresponding to the disturbance of homeostasis in individual cases, depending on the applied stimulus. Respectively: for 1) – an increase of entropy is temporary and is followed by a return to values before the application of the stimulus, 2) – a lasting change occurs, which consists in an increase of entropy to a new fixed level, 3) – change in entropy is so large that its value exceeds the so-called point of no return, which means that the disorder of homeostasis leads to cell death.

The application of luminescence imaging technique Single Photon Counting Imaging (SPCI) to the test cells have revealed that the emission of photons from different parts of the plant has a different intensity. When the plant suffered mechanical damage by cutting pseudoleaves, the emission from the damaged sites increased dramatically. This observation allows the damage to be located. Thanks to SPCI technique, it is also possible to track over time any repair processes.

The clear differentiation of UWL kinetics leads to the conclusion that monitoring its intensity can be a good research tool in environmental protection. It makes it possible to determine whether chemicals found in the aquatic environment are harmful to a given species of plants. It can be also assessed whether the degree of the harm threatens the entire population with extinction. Thus, the presented method can be used as an ecotoxicity test.