

LUMINOMETR DO BADANIA WPŁYWU OBNIŻANIA TEMPERATURY NA OPÓŹNIONĄ LUMINESCENCJĘ OBIEKTÓW ROŚLINNYCH

A. Brzóstowicz, A. Murkowski, A. Mila

Zakład Fizyki, Instytut Inżynierii Rolniczej, Akademia Rolnicza
ul. Papieża Pawła VI nr 3, 71-459 Szczecin
e-mail: fizyka@dedal.man.szczecin.pl

Streszczenie. W pracy przedstawiono budowę i zasadę działania kolejnych udoskonalanych wersji zestawu pomiarowego do badania wpływu niskiej temperatury na opóźnioną luminescencję fragmentów roślin. Aktualne, komputerowe stanowisko umożliwia badanie wpływu niskiej temperatury na dowolne składowe opóźnionej luminescencji fragmentów roślin przy różnych czasach i natężeniach fotowzbudzenia. Wyniki badań uzyskiwane przy pomocy tego zestawu przyczynią się do wyjaśnienia niektórych mechanizmów oddziaływania niskiej temperatury na rośliny.

Słowa kluczowe: opóźniona luminescencja, układy pomiarowe, niska temperatura.

WSTĘP

Luminescencja, to zjawisko emisji promieniowania elektromagnetycznego o natężeniu większym od promieniowania cieplnego w danej temperaturze i czasie trwania większym od 10^{-10} s. Luminescencją nazywa się także promieniowanie emitowane w procesie luminescencji. Urządzenia służące do pomiaru luminescencji noszą nazwę luminometrów.

W badaniach biologicznych i diagnostyce rolniczej wykorzystuje się niektóre metody luminescencyjne. W badaniach początkowych reakcji fotosyntezy oraz wpływu na nie różnych czynników stresowych stosuje się m. in. pomiary opóźnionej luminescencji (OL) chlorofilu zlokalizowanego w tylakoidach chloroplastów [7,8,9,14,15]. Istotą takich pomiarów jest rejestracja fotowzbudzonej luminescencji

chlorofilu po ustalonym okresie czasu od wyłączenia światła wzbudzającego. W zależności od czasu jaki upłynął od zakończenia fotowzbudzenia badanej próbki roślinnej rejestrowane są różne składowe OL, a natężenie i charakter zaniku tych składowych informują o wewnątrzkomórkowych mechanizmach odpowiedzialnych za ich generację. OL chlorofilu znajdującego się w chloroplastach jest ściśle związana z fotosyntetycznym transportem elektronów i może dostarczać informacji o efektywności reakcji fazy świetlnej fotosyntezy. OL pośrednio informuje również o stanie błon tylakoidalnych [4,9,14].

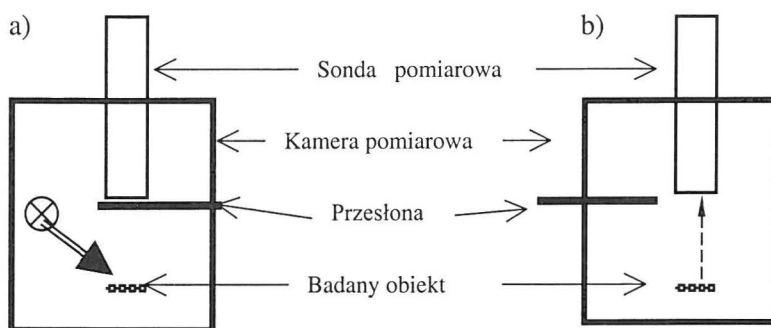
W Zakładzie Fizyki Akademii Rolniczej w Szczecinie od kilkudziesięciu lat prowadzone są badania zjawisk biofizycznych w roślinach z zastosowaniem metod luminescencyjnych do oceny wpływu różnych czynników stresowych na organizmy fotosyntetyzujące [1,3,10,11,12,13]. Zarówno interesujące wyniki badań, uzyskane patenty oraz efekty prac wdrożeniowych zachęcają nas, nie tylko do kontynuowania dotychczasowych poszukiwań naukowych, ale również do projektowania prototypowej aparatury badawczej oraz udoskonalania dotychczas używanych zestawów pomiarowych.

W przedstawionej pracy opisano kolejne wersje zestawów pomiarowych do badania wpływu niskiej temperatury na opóźnioną luminescencję (OL) chlorofilu w chloroplastach roślin. Wyniki badań prowadzonych przy użyciu zbudowanych urządzeń pozwalają na wyjaśnienie niektórych mechanizmów oddziaływania stresu temperaturowego na rośliny.

UKŁADY POMIAROWE

Zasada pomiaru opóźnionej luminescencji

Zasadniczym elementem zestawu jest światłoszczelna kamera pomiarowa (Rys. 1), do której wprowadza się badane obiekty (np. fragmenty liści). Badany obiekt najpierw zostaje naświetlony (fotowzbudzenie chlorofilu) przy zasłoniętym fotodetektorze, a następnie po wyłączeniu lampy zostaje odsłonięty fotodetektor (przerwa) i następuje rejestracja opóźnionej luminescencji (pomiar). Pełny zestaw do pomiaru opóźnionej luminescencji musi zawierać jeszcze układy zasilające, wzmacniające i rejestrujące sygnał.



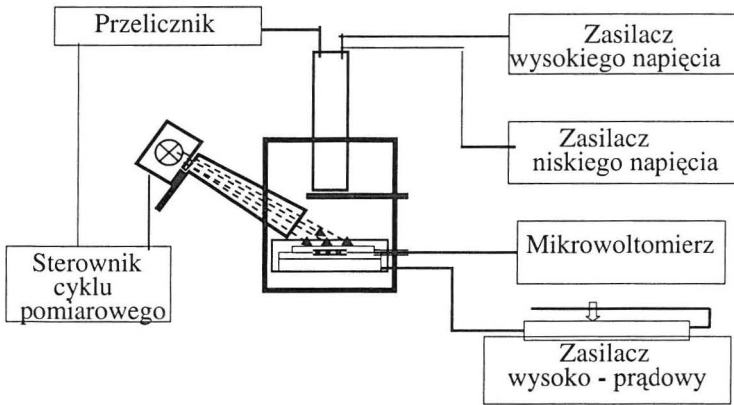
Rys. 1. Kamera do pomiaru opóźnionej luminescencji: a) fotowzbudzenie, b) pomiar.

Fig. 1. The delayed luminescence measuring camera: a) photoactivation, b) detection.

Pierwszy zestaw pomiarowy do badania opóźnionej luminescencji

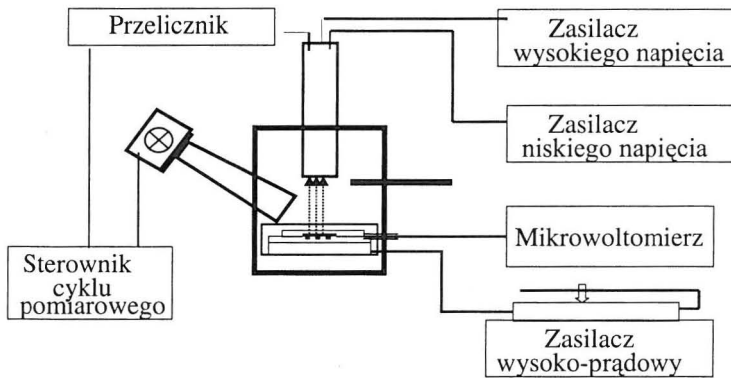
Jednym z zasadniczych elementów tego zestawu była światłoszczelna kamera pomiarowa z termoregulowanym stolikiem, na którym umieszczano badane próbki roślinne (Rys. 2 i 3). Stolik był chłodzony przez półprzewodnikową baterię termoelektryczną (ogniwa Peltiera). Temperaturę stolika mierzono termoparą przyłączoną do mikrowoltomierza, a regulację temperatury przeprowadzano „ręcznie” zmieniając przy pomocy opornicy suwakowej natężenie przepływającego prądu przez baterię termoelektryczną. Cykl pomiarowy natomiast sterowany był skonstruowanym specjalnie w tym celu sterownikiem mechaniczno-elektrycznym. Obiekt w kamerze (Rys. 2) wzbudzany był światłem lampy projekcyjnej (220 V, 150 W) umieszczonej w odpowiednim reflektorze. Po wybranym czasie naświetlenia następował określony czas przerwy w czasie której operator odpowiednimi przysłonami zasłaniał lampę i odsłaniał sondę pomiarową (Rys. 3). W sondzie znajdował się fotopowielacz (EMI 9558B), którego wieloalkaliczna fotokatoda (S-20) czuła także w zakresie dalekiej czerwieni (350 nm - 800 nm).

Fotopowielacz, zasilany wysokim napięciem ze stabilizowanego zasilacza ZWN 2,5 (POLON), pracował w układzie zliczania impulsów jednoelektronowych. W takim układzie każdy fotoelektron wybity z fotokatody przez kwant opóźnionej luminescencji i powieleniu na dynodach fotopowielacza, generował na wyjściu sondy pomiarowej impuls napięciowy o amplitudzie 1 V, który był rejestrowany przez przelicznik P-44 (POLON). Zarejestrowana suma impulsów jest proporcjonalna do tzw. sumy świetlnej, czyli ilości fotonów OL wyemitowanych w danym czasie przez badaną próbkę roślinną.



Rys. 2. Schemat blokowy pierwszego zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji (przesłony w pozycji „fotowzbudzenie”).

Fig. 2. Block diagram of the first measuring system of the delayed luminescence (shutters in “photoactivation” position).



Rys. 3. Schemat blokowy pierwszego zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji (przesłony w pozycji „pomiar”).

Fig. 3. Block diagram of the first measuring system of the delayed luminescence (shutters in “detection” position).

Cykl pomiarowy mógł być powtarzany w różnych temperaturach badanego obiektu, a przy odrobinie wprawy operatora można było uzyskać nawet liniową jej zmianę. Aby wykonywać pomiary opóźnionej luminescencji w trakcie zmiany temperatury badanego obiektu konieczne było więc zaangażowanie dwóch operatorów. Jeden przesuwał w odpowiednim momencie przysłony i zapisywał wskazania przelicznika, a drugi regulował temperaturę. Ta duża niedogodność skłoniła nas do opracowania stosunkowo prostego, mechaniczno-elektrycznego programatora i regulatora temperatury, który został zintegrowany ze sterownikiem cyklu pomiarowego. Pozwoliło to zrezygnować z pomocy i drugiego operatora.

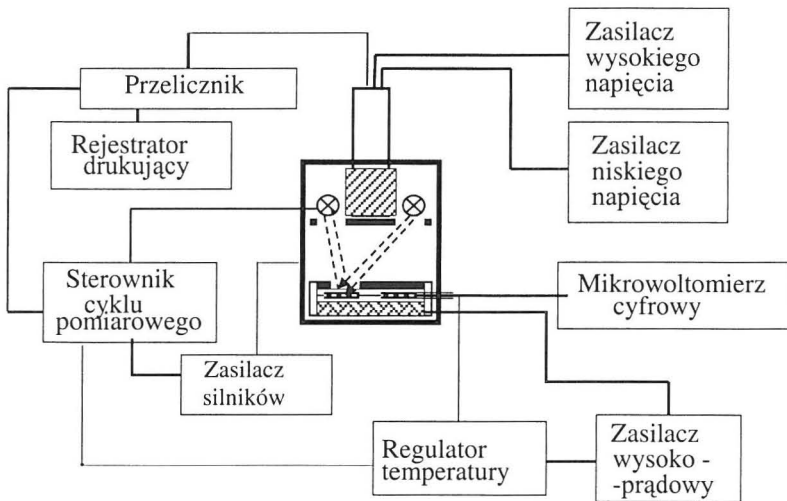
Zautomatyzowany zestaw pomiarowy

W toku dalszych prac projektowo - konstrukcyjnych zbudowano [6] nowy typ kamery i dostosowano do niej unowocześniony zestaw aparatury pomocniczej (Rys. 5 i 6). Powierzchnię termoregulowanego stolika pomiarowego podzielono na 6 sektorów. Na nich umieszczano 5 fragmentów liści (Rys. 4; z lewej), a jeden sektor pozostawał pusty, aby można było w tym miejscu wykonać pomiar „tła” (kontrolny). Wszystkie próbki liściowe były przyciśnięte termoizolacyjną, przezroczystą płytką ze szkła organicznego również podzieloną na sześć części rozdzielonych nieprzezroczystym materiałem, tak aby sektory były światłoszczelnie odizolowane od siebie. Nad płytką znajdowała się ruchoma przesłona obrotowa odsłaniająca jeden sektor (Rys. 4; z prawej). Ponadto, do wzbudzenia badanych obiektów zastosowano dwie lampy projekcyjne, celem równomiernego oświetlenia wszystkich sektorów. Aby lampy te nie nagrzewały sondy pomiarowej zastosowano na niej chłodnicę wodną. W kamerze pomiarowej były dwa silniki do „napędu” przesłony. W zestawie wykorzystano również rejestrator drukujący (ERD103), co wyeliminowało konieczność ręcznego zapisywania wskazań przelicznika. Schemat pomiaru był następujący: w ustalonej temperaturze (np. 0°C) elektroniczny programator włączał np. na 1 s lampy projekcyjne i następowało fotowzbudzenie fragmentu liścia leżącego na odsłoniętym sektorze (Rys. 5.). Następnie, w trakcie jednosekundowej przerwy mechaniczna przesłona odsłaniała sondę pomiarową. Po przerwie, programator otwierał na 1s bramkę przelicznika i następowało zliczanie impulsów z przedwzmacniacza sondy pomiarowej (Rys. 6). Liczba impulsów napięciowych była proporcjonalna do sumy fotonów OL wyemitowanych przez wzbudzone cząsteczki chlorofilu w badanym fragmencie liścia.



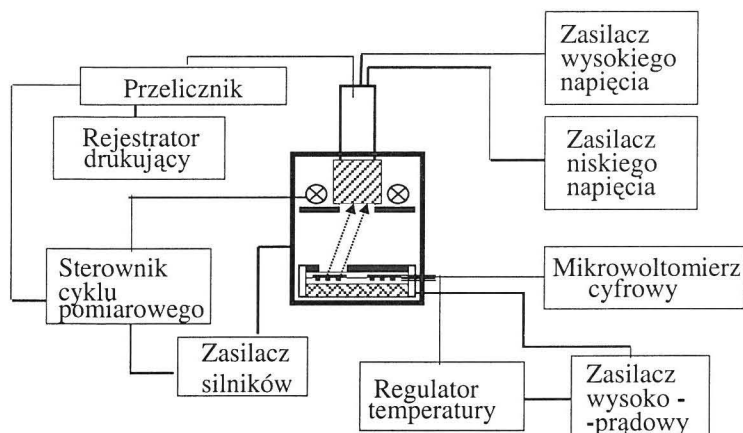
Rys. 4. Stolik pomiarowy (z lewej) podzielony na 6 sektorów (ułożono pięć próbek) i przesłona obrotowa (z prawej) wybierająca próbkę.

Fig. 4. The measurement table (in left) divided into 6 sectors (placed five samples) and rotating shutter (in right) exposing one sample.



Rys. 5. Schemat blokowy zautomatyzowanego zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji w różnych temperaturach (przesłony w pozycji „fotowzbudzenie”).

Fig. 5. Block diagram of the automated system measuring the delayed luminescence at different temperatures (shutters in “photoactivation” position).



Rys. 6. Schemat blokowy zautomatyzowanego zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji w różnych temperaturach (przesłony w pozycji „pomiar”).

Fig. 6. Block diagram of the automated system measuring the delayed luminescence at different temperatures (shutters in “detection” position).

W następnej sekundzie przesłona zasłaniała fotopowielacz w sondzie pomiarowej, a silnik przesłony obrotowej odślaniał fragment liścia leżącego na kolejnym sektorze i powtarzany był poprzedni cykl pomiarowy. Po pomiarach OL pięciu próbek, na ostatnim pustym sektorze stolika następował pomiar tła aparaturowego. Wartość tła była następnie odejmowana od wyniku każdego z poprzednich 5 pomiarów. Po zakończeniu tej serii pomiarów, w czasie następnych 36 s programator ustalał nową, obniżoną np. o 1°C temperaturę stolika i następowało powtórzenie, takiej samej jak poprzednio serii pomiarowej (pięciu próbek i tła).

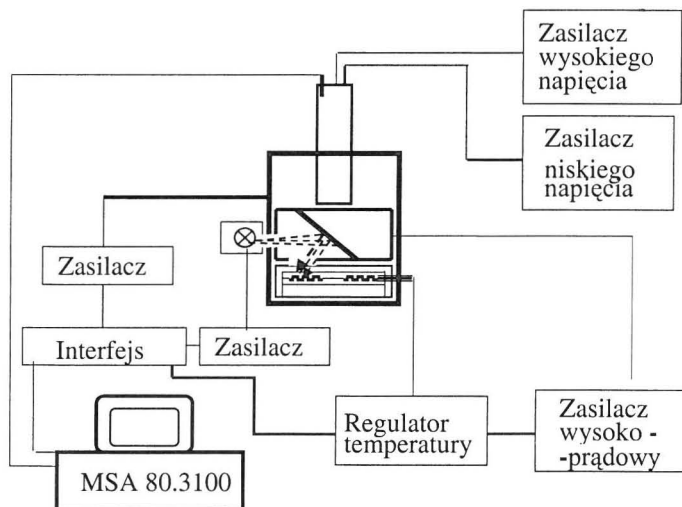
Pomimo, że przy użyciu tego zestawu pomiarowego wykonano wiele badań, to niestety rozwiązania techniczne zastosowane w kamerze były dość zawodne i nie spełniały naszych wszystkich oczekiwań. Przystąpiono więc do dalszych prac projektowo-konstrukcyjnych.

Mikrokomputerowy zestaw

Kolejna przebudowa układu pomiarowego (Rys. 7 i 8) polegała na wykonaniu nowej kamery oraz zastosowaniu mikrokomputera do sterowania procesem pomiarowym, temperaturą i zbierania danych pomiarowych. W kamerze zastosowano, jak poprzednio, stół podzielony na 6 sektorów. Natomiast nowym

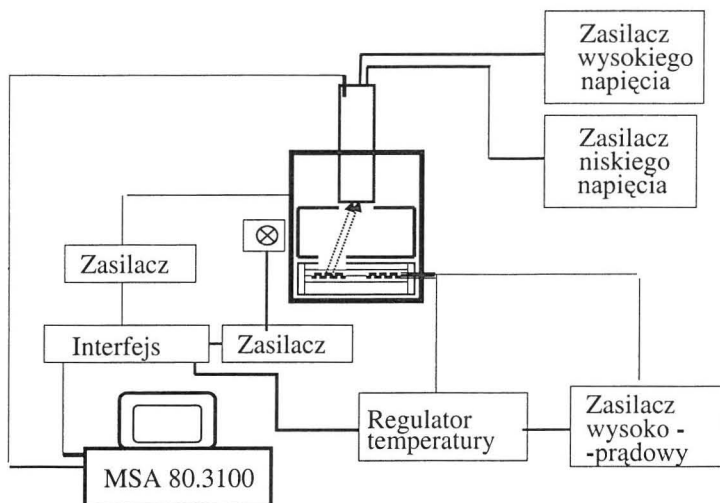
rozwiązaniem były zintegrowane przesłony i przemieszczające się zwierciadło. Zastosowanie zewnętrznego źródła wzbudzającego umożliwiało łatwą zmianę natężenia światła (bez zmiany widma) poprzez zmianę odległości od kamery pomiarowej. Elementy te napędzane były jednym silnikiem prądu stałego (12V, 70W). Zastosowany wówczas (połowa lat 80-tych) system mikrokomputerowy MSA 80.3100 (UNITRA–CEMI Szczytno) zawierał mikroprocesor INTEL 8080, pamięć operacyjną (RAM) 64kB, pamięć dodatkową (DRAM) 180kB oraz dyskową 2 x 360 kB. Układ pracował pod systemem OS/M (CP/M 2.2) natomiast program sterujący opracowano na wersję 5.21 języka BASIC-80, a podprogramy obsługi pakietów specjalizowanych w języku ASSEMBLER. Oprogramowanie umożliwiało zbieranie i przechowywanie stosunkowo dużej liczby danych oraz dawało opcjonalne możliwości elastycznej modyfikacji zarówno parametrów pomiarowych jak czasu, temperatury i fotowzbudzenia.

W toku dalszej przebudowy i modernizacji zestawu pomiarowego zastąpiono termoparę czujnikiem Pt 100, a regulator temperatury zastąpiono odpowiednim pakietem komputerowym. Ponadto zintegrowano w jednej obudowie zasilacze, wzmacniacze i sterowniki. Unowocześnione zestawy pomiarowe pozwoliły na rozszerzenie i przyspieszenie prac badawczych [1,3].



Rys. 7. Schemat blokowy mikrokomputerowego zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji w różnych temperaturach (przesłony w pozycji „fotowzbudzenie”).

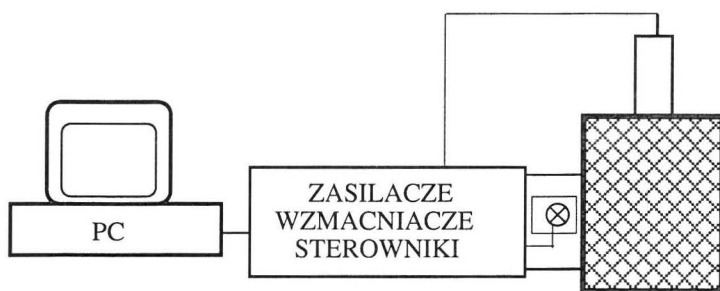
Fig. 7. Block diagram of the microcomputer system measuring the delayed luminescence at different temperatures (shutters in “photoactivation” position).



Rys. 8. Schemat blokowy mikrokomputerowego zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji w różnych temperaturach (przesłony w pozycji „pomiar”).

Fig. 8. Block diagram of the microcomputer system measuring the delayed luminescence at different temperatures (shutters in “detection” position).

Po nadejściu „ery” komputerów osobistych typu PC przebudowano kolejny raz układ pomiarowy z wykorzystaniem kamery pomiarowej z poprzedniego zestawu (Rys. 9). Oprogramowanie sterujące opracowano w języku PASCAL.



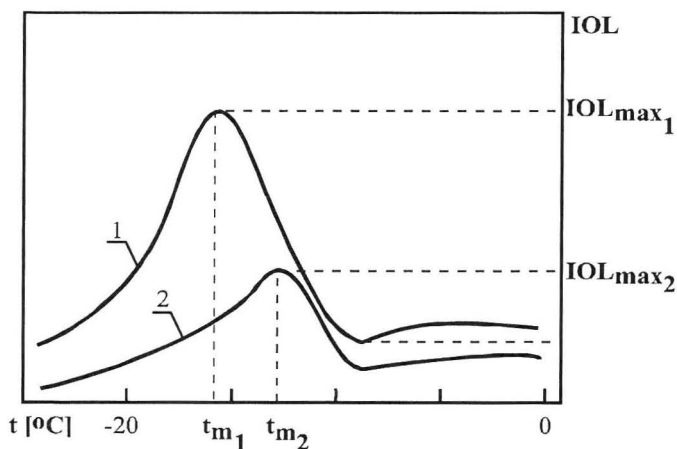
Rys. 9. Schemat blokowy zmodyfikowanego mikrokomputerowego zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji w różnych temperaturach.

Fig. 9. Block diagram of the modified microcomputer system measuring the delayed luminescence at different temperatures.

Komputer steruje urządzeniami wykonawczymi, za pomocą specjalnego pakietu typ LC-015-1612 (Egmont Instruments s.c.). Stolik pomiarowy chłodzony jest lub ogrzewany za pomocą nowej, bardzo wydajnej, półprzewodnikowej baterii termoelektrycznej (Melcor USA). Na stoliku pomiarowym można teraz obniżać temperaturę z prędkością $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ aż do -25°C . Temperatura na stoliku pomiarowym mierzona jest za pomocą liniowego układu scalonego (LM 35).

PRZYKŁAD ZASTOSOWANIA

Na Rys. 10 przedstawiono, uzyskane za pomocą wyżej opisanych układów pomiarowych, zależności natężenia opóźnionej luminescencji (IOL) od temperatury (t), podczas jej obniżania. Zależności o takim charakterze zmian uzyskuje się dla większości fragmentów liści roślin ozimych w optymalnych warunkach pomiarowych. Obserwowany początkowo szybki wzrost IOL podczas obniżania temperatury może być spowodowany hamowaniem transportu elektronowego po stronie akceptorowej fotosyntetycznego transportu elektronowego. Zmniejszanie IOL po osiągnięciu maksimum spowodowane może być blokowaniem fotosyntetycznego transportu elektronowego po stronie donorowej czyli w systemie fotolizy wody.



Rys. 10. Typowe krzywe zależności natężenia opóźnionej luminescencji (IOL) fragmentów liści od temperatury (t) dla dwóch roślin różniących się mrozoodpornością: 1 – dla rośliny odpornej, 2 – dla rośliny mniej odpornej; t_{m1} i t_{m2} , temperatura w której występowała maksymalna wartość IOL, odpowiednio $IOL_{\max1}$ i $IOL_{\max2}$.

Fig. 9. Relationship between the delayed luminescence intensity (IOL) and temperature (t) in the different frost resistance plants: 1 - for the high frost resistance, 2 - for the low frost resistance. t_{m1} and t_{m2} temperatures at which the maximum of IOL occurred, $IOL_{\max1}$ and $IOL_{\max2}$, respectively.

Przeprowadzone liczne badania wpływu obniżania temperatury na IOL fragmentów liści różnych odmian i gatunków zbóż i rzepaku ozimego wykazały, że zarówno temperatura, w której występowało maksimum natężenia IOL jak i względny wzrost natężenia OL zależą od aktualnej mrozoodporności badanej rośliny [1,3,5].

PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszej pracy różne rozwiązania techniczne zarówno kamery pomiarowej jak i całego zestawu pomiarowego umożliwiają wyróżnić w kolejności kilka punktów (etapów) postępu zastosowanych rozwiązań w poszczególnych zasadniczych układach pomiarowych:

1. Układ sterujący cyklem pomiarowym:
 - elektroniczno - mechaniczny (konstrukcja Zakład Fizyki)
 - elektroniczny (Zakład Fizyki)
 - komputer MSA 80.3100
 - komputer typu PC
2. Termometr:
 - termopara
 - termorezystor Pt 100
 - liniowy układ scalony LM 35
3. Regulator temperatury:
 - „ręczny”
 - elektroniczno – mechaniczny (konstrukcja Zakład Fizyki)
 - elektroniczny (UNITRA CEMI)
 - elektroniczny (Zakład Fizyki)
4. Przesłony:
 - dwie („ręczne”)
 - dwie (dwa silniki)
 - dwie (jeden silnik)

Przedstawione w niniejszej pracy zestawy pomiarowe, zwłaszcza w ostatniej wersji (podkreślone), umożliwiają badanie wpływu niskiej temperatury na dowolne składowe opóźnionej luminescencji fragmentów roślin przy różnych czasach i natężeniach fotowzbudzenia. Wyniki badań prowadzonych przy użyciu zbudowanych urządzeń przyczyniają się do wyjaśniania niektórych mechanizmów oddziaływania stresu temperaturowego na rośliny i zostały przedstawione w wielu publikacjach omówionych w pracach Brzostowicza [3,5].

Zbudowane stanowiska pomiarowe mogą być również wykorzystane do badania zaburzeń pracy aparatu fotosyntetycznego roślin, które zostały poddane działaniu czynników stresowych występujących w środowisku. Istnieje też możliwość wykorzystania tych stanowisk do badania luminescencji innych obiektów zarówno roślinnych jak i zwierzęcych.

Aktualnie trwają dalsze prace projektowe i konstrukcyjne nad modyfikacją rozwiązań technicznych zastosowanych w kamerze pomiarowej.

PIŚMIENNICTWO

1. **Brzóstowicz A.:** Determination of delayed photosynthetic apparatus luminescence as a possible method of frost resistance evaluation in wheat leaves. *Acta Physiol. Plant.*, 12(3), 187-191, 1990.
2. **Brzóstowicz A.:** Mikrokomputerowy zestaw do badania wpływu temperatury na natężenie opóźnionej luminescencji fragmentów liści. *Zesz. Nauk. AR Szczecin, Rolnictwo, Seria Techn.*, 159(56), 41-47, 1993.
3. **Brzóstowicz A.:** Zastosowanie opóźnionej luminescencji do badania wpływu niskiej temperatury na rośliny uprawne. *Wyd. AR w Szczecinie, Rozprawy 188*, 1999.
4. **Brzóstowicz A.:** Luminescencja w procesie fotosyntezy. *Acta Agrophysica*, 45, 31-42, 2001.
5. **Brzóstowicz A.:** Zastosowanie opóźnionej luminescencji do badania wpływu niskiej temperatury na rośliny uprawne. XII Seminarium Sekcji „Mrozoodporność” KNO PAN w Warszawie, Skierniewice 17-18.05.2001, *AR Poznań, Materiały*, 47-50, 2001.
6. **Brzóstowicz A., Murkowski A.:** Kwantometryczne urządzenie do oceny mrozoodporności zbóż ozimych. *Zesz. Nauk. AR w Szczecinie, Rolnictwo XLII, Seria Techn.*, 129, 3-8, 1987.
7. **Gaevskii N. A., Morgun V. N.:** Ispolzovanie peremennoi i zamedlennoi fluorescencii chlorofilla dla izučfnia fotosinteza rasteni. *Fiziol. Rast.*, 40 (1), 136-145, 1993.
8. **Govindjee, Amesz J., Fork D. Ch. /ed./:** Light emission by plants and bacteria. Academic Press, INC (London) Ltd., 1986.
9. **Lavorel J.:** Luminescence. W: Govindjee /ed./, *Bioenergetics of photosynthesis*, New York, Academic Press, 223-317, 1975.
10. **Murkowski A.:** Luminescencyjne metody badania wpływu herbicydów na organizmy fotosyntetyzujące. Praca doktorska, *AR Szczecin*, 1975.
11. **Murkowski A.:** Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencję chlorofilu w aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych. Monografia. *Acta Agrophysica*, 61, 3-158, 2002.
12. **Murkowski A., Brzóstowicz A., Grabikowski E., Prokowski Z.:** Luminescencyjna metoda bioindykacji fitotoksycznych zanieczyszczeń środowiska. *Post. Fiz. Med.* 17, 3/4, 85-91, 1982.
13. **Prokowski Z.:** Nowe sposoby pomiaru parametrów luminescencyjnych glonów jako wskaźnik zmian w środowisku. *Wyd. AR w Szczecinie, Rozprawy 205*, 2002.

14. **Sławiński J.:** Metody badania słabych emisji fotonowych z układów biologicznych. W: Twardowski J. /ed./, Biospektroskopia 3, PWN, Warszawa, 107-214, 1989.
15. **Veselovskii V. A., Veselova T. V.:** Luminescencia rasteni. Moscov, Nauka, 1990.

LUMINOMETER FOR DELYED LUMINESCENCE RESEARCH DURING THE LOWERING TEMPERATURE OF PLANT OBJECTS

A. Brzóstowicz, A. Murkowski, A. Mila

Department of Physics, University of Agriculture, ul. Papieża Pawła VI No 3, 71-459 Szczecin

Abstract. The different measuring systems of the delayed luminescence of plant objects at lowering temperatures are shown in this work. Up-to-date, a microcomputer set-up makes possible to study different components of delayed luminescence in the function of controlled temperature changes in leaf fragments at various time and intensity of photoactivation. These research results might lead to explain some phenomenon of low temperature influence on plants.

Key words: delayed luminescence, measurement systems, low temperatures.