

ANTONI MURKOWSKI  
Akademia Rolnicza w Szczecinie

## BIOCHEMILUMINESCENCJA — WSKAŹNIKIEM STANU FIZJOLOGICZNEGO ROŚLINY I JEJ ODPORNOŚCI NA EKSTREMALNE CZYNNIKI ZEWNĘTRZNE

### *Wstęp*

W miarę rozwoju nauk przyrodniczych, coraz większą rolę przypisuje się roli światła w procesach życiowych. Wymownym tego wyrazem jest powstanie nowej gałęzi wiedzy — fotobiologii.

Szczególnie ważną rolę spełnia światło przy wzroście i wegetacji roślin zielonych, dla których jest ono niezbędnym czynnikiem fotomorfogenetycznym i jedynym źródłem energii. Do niedawna można było badać procesy związane z absorpcją lub emisją stosunkowo silnych strumieni świetlnych, ponieważ uwarunkowane to było zbyt niską czułością zarówno emulsji fotograficznych jak i przyrządów fotoelektrycznych (fotokomórka, fotoogniwo). Pod koniec lat czterdziestych skonstruowano przyrząd lampowy wykorzystujący, podobnie jak fotokomórka, zjawisko fotoelektryczne zewnętrzne oraz dodatkowo jeszcze efekt powielania elektronów poprzez emisję wtórną z pomocniczych elektrod — dynod. Przyrząd ten, nazwany fotopowielaczem lub krotnikiem fotoelektrycznym, posiada czułość około milion razy większą niż fotokomórka.

Fotopowielacz, przewyższający swoją czułością nawet oko ludzkie, pozwala w sposób obiektywny rejestrować i badać bardzo słabe strumienie światła. Zastosowanie fotopowielacza jako detektora światła w zestawach pomiarowych wykorzystywanych w badaniach biologicznych i chemicznych zapoczątkowało nową metodykę badań — detekcję ultrasłabych świeceń (USS).

W latach 1954—1955, dwaj włoscy uczeni L. Colli i V. Facchini jako pierwsi, posługując się fotopowielaczem oraz elektroniczną aparaturą wzmacniająco-rejestrującą, stwierdzili bezspornie istnienie spontanicznej emisji bardzo słabego światła z tkanek roślinnych. Obiektem ich badań były różne kielki roślinne, z których emisja ultrasłabej biochemiluminescencji (UBCL) jest stosunkowo duża (Colli i Facchini 8). Prace nad UBCL tkanek roślinnych i zwierzęcych podjęte zostały ponownie przez kilka zespołów

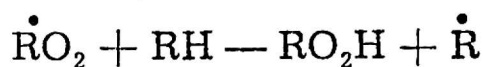
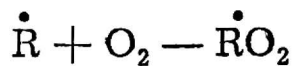
uczonych radzieckich w roku 1959 i są prowadzone na coraz większą skalę przez stale wzrastającą liczbę uczonych zarówno w Związku Radzieckim jak i w innych krajach. Obecnie można stwierdzić, że każdy żywy obiekt wysyła bardzo słabe promieniowanie w zakresie widzialnym lub nadfiolecie (Tarusow, Iwanow, Poliwoda i Żurawlow 31, Koniew, Troitsky i Katibników 11, Stauff i Reske 28, Władimirow 37, Sławiński, Grabikowski i Murkowski 26, Steele i wsp. 30, Sławiński, Grabikowski i Milczarek 27). Niekiedy można spotkać się z emisją stosunkowo silnego świecenia, obserwowanego bez trudu gołym okiem, a wysyłanego przez niektóre gatunki grzybów, bakterii oraz niższe organizmy zwierzęce, przeważnie morskie.

Świecenie to, nazwane bioluminescencją, spowodowane jest zazwyczaj reakcjami utleniania w obecności enzymów nazwanych lucyferazami (Mc Elroy, Seliger 18). Biologiczna rola bioluminescencji nie została w pełni wyjaśniona, nie znane są także przyczyny, które spowodowały wykształcenie się tej funkcji fizjologicznej u niewielkiej stosunkowo liczby organizmów należących do rozmaitych typów świata zwierzęcego, a nawet roślinnego (Sławiński 23, 24, 25). Bioluminescencji, występującej sporadycznie i jedynie u zwierząt niższych (do ryb włącznie), nie należy utożsamiać z UBCL, która jest znacznie słabsza, a jej występowanie jest powszechne w całej żywej materii.

### *Mechanizmy emisji UBCL*

Obecny stan wiedzy, dotyczący emisji UBCL przez żywe organizmy, pozwala określić w ogólnych zarysach, niektóre z możliwych mechanizmów jej powstawania; nie jest natomiast w stanie wyjaśnić jednoznacznie jej roli biologicznej.

Substratem UBCL są najczęściej lipidy zawarte w mitochondriach oraz w błonach komórkowych (Stauff i Reske 28, Tarusow, Żurawlew 32, Tarusow 33, Władimirow 37) stanowiące około 25% ich suchej masy. Lipidy, w obecności tlenu ulegają utlenieniu wytwarzając przy tym związki nad-tlenkowe. Związki te ulegają rozpadowi, a powstałe rodniki nad-tlenkowe rekombinują emitując kwanty światła. Reakcja samoutleniania lipidów ma charakter łańcuchowy i samoprzyspieszający (Władimirow 37)

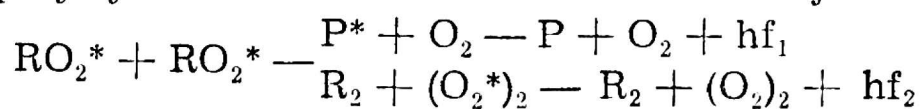


$\dot{R}$  — rodniki kwasu tłuszczowego,

RH — kwas tłuszczowy,

$\dot{RO}_2$  — rodnik nad-tlenkowy.

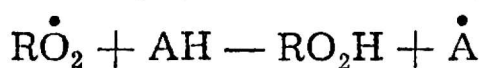
Związki nadtlencowe ( $RO_2H$ ) ulegają rozkładowi, w wyniku czego tworzą się nowe rodniki nadtlencowe  $\dot{R}O_2$ , które ulegają rekombinacji z wytworzeniem wzbudzonych ketonów P lub wzbudzonego kompleksu  $(O_2^*)_2$  (Vassil'ev i Vichutinsky 38, Stauff 29). Wzbudzone drobiny dezaktywują się emitując przy tym światło o barwie niebieskozielonej.



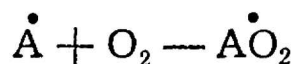
$h$  — stała Plancka,

$f_1, f_2$  — częstotliwości drgań emitowanych kwantów.

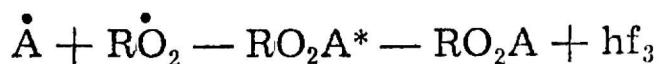
Powyższy nieenzymatyczny proces utleniania przebiega równolegle z fermentacyjnym  $\beta$ -utlenianiem lipidów sprzężonym z oksydacyjną fosforylacją. Kierunek metabolizmu tłuszczów na drodze  $\beta$ -utleniania jest zabezpieczony poprzez system enzymatyczny i obecność endogennych antyutleniaczy w środowisku lipidowym. W ten sposób konkurencyjny proces nieenzymatycznego utleniania, wymagający przy tym aż 257 kJ/mol (Władimirow i Lwowa 36) energii aktywacji, aby generować wzbudzone drobiny zdolne do emisji światła, ma małe prawdopodobieństwo zaistnienia. Z wymienionych wyżej powodów staje się zrozumiała bardzo mała intensywność spontanicznie emitowanej UBCL ze zdrowych  $\bar{T}$  nie uszkodzonych tkanek roślinnych lub zwierzęcych. Na widmo chemiluminescencji lipidów ma wpływ obecność w nich endogennych antyutleniaczy (AH) takich jak fosfolipidy, tokoferole, karoteny i inne. Antyutleniacze reagują z rodnikami nadtlencowymi redukując je do związków nadtlencowych, przy czym tworzą się rodniki antyutleniaczy (Władimirow 37).



Powstałe rodniki A wiążą tlen zapobiegający w ten sposób utlenianiu lipidów



Związek, który powstał w wyniku powyższej reakcji jest w dalszym ciągu rodnikiem, który rekombinując z rodnikiem nadtlencowym wyzwala energię wystarczającą do emisji kwantu światła.



Ostatnia reakcja uwalnia mniejszą energię niż reakcja rekombinacji dwóch rodników nadtlencowych i dlatego  $hf_3$  ma mniejszą energię niż  $hf_1$  lub  $hf_2$ . Jest to powodem rozciągnięcia się widma UBCL w stronę fal dłuższych. Nie wszystkie bezpośrednio wzbudzone drobiny wyemitują kwanty światła, ponieważ ich energia może być w pewnych przypadkach przeniesiona na inne silnie fluoryzujące drobiny aktywatorów (Lee i Seliger 13, Khan i Kasha 10). W komórkach roślinnych aktywatorami mogą być: ergosterol, porfiryny, lecytyna, a także fluoryzujące barwniki jak kwercytyna,

kumaryna, adrenolutin (Żurawlew, Filipow i Simonow 39, Kruk i Sławińska 12). W wyniku takiego przeniesienia energii mamy do czynienia z chemiluminescencją aktywowaną, której widmo, wydajność kwantowa, oraz czas życia w stanie wzbudzonym są charakterystyczne dla drobin aktywatora. Fakt, że do emisji ultrasłabego świecenia biologicznego niezbędny jest tlen, potwierdza jego chemiluminescencyjną naturę.

Oprócz podanych modeli mechanizmu generacji UBCL, w których głównymi substratami reakcji chemiluminescencyjnych są lipidy, godnym uwagi jest nieco inny model emisji słabego świecenia, w którym istotną rolę spełniają dwie ważne biologicznie grupy związków — polifenole i chinony (Sławiński 24, Sławiński 25, Sławińska i Sławiński 21, 22). Związki te mają sprzężone układy  $\pi$ -elektronowe i są podatne na reakcje redoksove. W środowisku lipidowym polifenole i chinony działają jako antyutleniacze reagując z  $\dot{R}O_2$  i tym samym osłabiają UBCL. W warunkach zaburzeń metabolicznych lub uszkodzenia struktury komórki (homogenizacja, hydroliza, UV, procesy glikolityczne i in.) następuje uwolnienie polifenoli z ich glikozydów oraz ich enzymatyczne lub nieenzymatyczne utlenianie z emisją światła. Ponieważ UBCL jest sumą zarówno niektórych z wymienionych wyżej jak i może jeszcze innych dotychczas nie poznanych chemiluminescencji, jej widmo rozciąga się w szerokim paśmie od 450 do 610 nm i ma słabo wyrażoną strukturę. Ze względu na ogólnie niskie natężenie UBCL, określenie jego widma jest trudnym zagadnieniem. Standardowe metody takie jak monochromator z fotopowielaczem czy też zestaw filtrów interferencyjnych względnie absorpcyjnych są przeważnie nieprzydatne ze względu na silne osłabienie strumienia i tak już bardzo słabego światła. Jediną stosowaną dotychczas metodą jest wykorzystanie filtrów granicznych o dużym współczynniku transmisji. Wyznaczone w ten sposób widmo UBCL wskazuje, że chemiluminescencyjne świecenie żywych tkanek zajmuje dużą część zakresu widzialnego, od ok. 450 nm do ok. 600 nm ze słabo zaznaczonym maksimum w okolicach 530—550 nm. Skład spektralny nie zależy ani od temperatury, ani od działania metabolicznych inhibitorów. Kształty widm UBCL z różnych tkanek różnych roślin nie wykazują istotnych różnic (Władimirow 37, Mamiedow, Popow i Koniew 16).

### *Interpretacja charakteru emisji UBCL*

Chociaż współczesny stan wiedzy nie gwarantuje właściwego i jednoznacznego wyjaśnienia całego złożonego mechanizmu UBCL, jak również i jej sensu biologicznego, to jednak jest ona już obecnie wykorzystywana jako metoda analityczno-badawcza w rolnictwie, medycynie i biologicznych badaniach podstawowych. UBCL pozwala określać kinetykę i badać ener-

getykę niektórych procesów biochemicznych, a także śledzić wpływ czynników środowiskowych na metabolizm organizmów roślinnych i zwierzęcych.

Zgodnie z przedstawioną na wstępie hipotezą emisji UBCL z lipidów strukturalnych na skutek ich utleniania, zasadniczą rolę mają do spełnienia antyutleniacze (Tarusow, Żurawlew 32). Antyutleniacze, będące inhibitorami reakcji utleniających są niezbędnym składnikiem lipidowo-białkowych struktur błon komórkowych. Dzięki właściwemu stężeniu inhibitorów utlenianie lipidów w tlenowym środowisku następuje powoli i ma charakter stacjonarny. Taki sam charakter oraz względnie niską intensywność posiada UBCL żywej i zdrowej komórki. Inhibitory utleniania ulegają zużyciu i muszą być sukcesywnie dostarczane do środowiska lipidowego, aby zostało utrzymane dostatecznie duże ich stężenie. Ekstremalne wpływy czynników zewnętrznych naruszające lipidowo-białkowe kompleksy błon komórkowych i zakłócające transport antyutleniaczy do lipidów strukturalnych powodują rozwijanie się reakcji łańcuchowej utleniania wraz z towarzyszącym wzrostem intensywności UBCL. Jeżeli uszkodzenie białkowo-lipidowego kompleksu przekroczy granice homeostazy następuje gwałtowne przyspieszenie reakcji, już niekontrolowanego utleniania. Zjawisku temu towarzyszy stosunkowo silny „rozbłysk“ UBCL nazwany obrazowo „krzykiem komórki“ (Władimirow 37, Wieiełowski i Dżanumow 35). Po tym silnym wzroście natężenia świecenia następuje jego spadek do poziomu tła. Opisanie wyżej zjawisko świadczy o nieodwracalnym rozsprzęgnięciu metabolizmu komórki, a w szczególności, zahamowaniu transportu antyutleniaczy do struktur lipidowych. Spowodowało to na tyle duże obniżenie antyutleniającej aktywności (AOA) kompleksu białkowo-lipidowego błon komórkowych, że w konsekwencji doprowadziło do śmierci komórki (Agawierdiew, Doskocz i Tarusow 2).

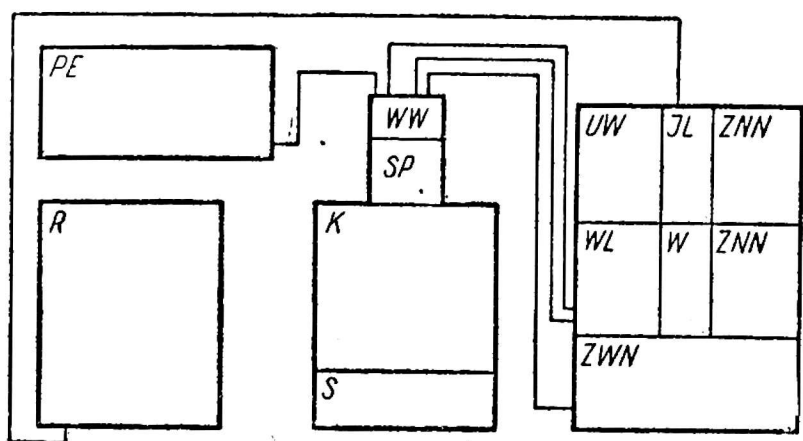
#### *Metodyka i aparatura pomiarowa wykorzystywana w detekcji UBCL*

Jak już zaznaczono we wstępie, natężenie emisji UBCL jest bardzo małe i dlatego też zostało stosunkowo niedawno wykryte. Homogenaty tkanek roślinnych oraz zwierzęcych emitują  $10^5$ — $10^8$  kwantów/g·s, natomiast tkanki nieuszkodzone wykazują natężenie UBCL o ok. dwa rzędy niższe (Poliwoda 20, Awierjanow i wsp. 5).

Przy pomiarach należy uwzględnić warunki geometryczne komory reakcyjnej, odbicia i pochłanianie światła, a także wydajność kwantową fotokatody fotopowielacza, która zwykle nie przekracza kilkunastu procent. Jak z powyższego widać sygnał UBCL rejestrowany przez układ detekcyjny nie przekracza na ogół, kilkuset impulsów w ciągu sekundy z grama żywej

i nieuszkodzonej tkanki. W praktyce zachodzi niejednokrotnie potrzeba pomiaru natężeń UBCL poniżej 1 impulsu w ciągu sekundy, a tymczasem liczba impulsów tła, seryjnego fotopowielacza jest rzędu  $10^2$ — $10^3$  impulsów w ciągu sekundy (w temperaturze pokojowej). W takim wypadku wykluczony jest pomiar bardzo słabych świeceń, ponieważ „gina” one we fluktuacjach impulsów własnych (tzw. prądu ciemnego) detektora. By pomiar był możliwy należy poprawić stosunek „sygnał-szum”. Spośród kilku metod najbardziej radykalnym okazało się ochładzanie fotopowielacza ciekłym azotem, zestalonym dwutlenkiem węgla względnie bateriami termoelektrycznymi. Ponieważ impulsy własne są wytwarzane w większości przez termoelektrody ochłodzenie fotokatody powoduje znaczne zmniejszenie ich liczby. Na przykład ochłodzenie fotopowielacza od  $+20^\circ\text{C}$  do  $-60^\circ$  za pomocą „suchego lodu” obniża poziom prądu ciemnego o dwa rzędy, przez co jego wielkość staje się porównywalna z UBCL zdrowych tkanek roślinnych. Przy wykorzystaniu selekcyjonowanych tzw. „małoszumiących” fotopowielaczy niektórych typów (np. FEU-42) można przeprowadzić pomiary UBCL także i w temperaturze pokojowej. Przy detekcji UBCL wykorzystuje się najczęściej pomiar całkowitej intensywności oraz kinetykę narastania lub zaniku świecenia.

Zestawy pomiarowe do detekcji UBCL są przedstawione w szeregu pracach różnych autorów (Władimirow 37, Tarusow, Iwanow i Petruszewicz 34, Sławiński, Grabikowski i Murkowski 26, Marenkow 17). Na rys. 1 przedsta-



Rys. 1. Schemat blokowy kwantometrycznego stanowiska pomiarowego. K — światłoszczelna kamera; S — szuflada z komorą reakcyjną; SP — sonda pomiarowa; WW — wtórnik White'a; PE — przelicznik elektronowy; R — rejestrator kompensacyjny; UW — układ wejściowy; WL — wzmacniacz liniowy; IL — integrator liniowy; W — wskaźnik; ZNN — zasilacz niskiego napięcia; ZWN — zasilacz wysokiego napięcia

wiono schemat blokowy stanowiska pomiarowego używanego przez autora do detekcji UBCL. Pomiary przeprowadzane są metodą kwantometryczną, przy czym możliwy jest pomiar ilości impulsów zliczanych przez przelicznik w określonym przedziale czasu i jednocześnie pomiar częstotliwości zarejestrowanych impulsów za pomocą integratora sterującego rejestrator kompensacyjny. Część elektroniczną układu detekcyjnego można zestawić ze standardowej aparatury radiometrycznej takiej jak sondy scyntylicyjne, przeliczniki elektronowe, integratory liniowe, a zwłaszcza spektrometry

gamma. Aparatura radiometryczna w szerokim asortymencie jest produkowana przez wiele wyspecjalizowanych firm np. „Polon“, „Tesla“, „Packard“, „Nuclear Chicago“ i inne. Możliwość wykorzystania szczytowych osiągnięć elektroniki radiometrycznej jest bardzo sprzyjającą okolicznością w badaniach słabych świeceń.

### *Aspekty biologiczne i przykłady zastosowania UBCL w celach diagnostyki rolniczej*

Intensywność i charakter emisji UBCL roślin zależą od ich stanu fizjologicznego. Niski i stabilny poziom spontanicznej biochemiluminescencji tkanek sygnalizuje właściwą koncentrację swobodnych rodników, odpowiednią ilość endogennych antyutleniaczy w lipidach komórkowych, sprawny transport na poziomie subkomórkowym oraz ogólnie stacjonarny i kontrolowany przebieg metabolizmu. Oddziaływanie różnych czynników fizycznych i chemicznych w stopniu przekraczającym możliwość ich kompensacji przez rośliny, doprowadza do nieodwracalnych uszkodzeń organizmu. Ciekawym zagadnieniem wydawało się śledzenie, niejako „na gorąco“ przebiegu reakcji rośliny na szkodliwe czynniki egzogenne oraz określenia ekstremalnych ich wielkości powyżej których niemożliwa jest wegetacja. Do negatywnych czynników zewnętrznych można zaliczyć: wysokie i niskie temperatury, zasolenie gleby, wpływy dużych dawek herbicydów, nawozów sztucznych, detergentów, a także choroby wirusowe i grzybowe (Mamiedow, Popow i Koniew 16). Wszystkie powyższe szkodliwe oddziaływania natury fizycznej, chemicznej czy nawet mikrobiologicznej w sposób bezpośredni lub pośredni wpływają na zakłócenie transportu wewnątrzkomórkowego, naruszenie trwałości kompleksu białkowo-lipidowego błon komórkowych i rozregulowanie stacjonarnej przemiany materii. W konsekwencji nastąpić powinno zakłócenie równowagi pomiędzy ubytkiem endogennych inhibitorów reakcji utleniających w lipidach strukturalnych, a jego odnawianiem co doprowadziłoby do wzmożenia utleniania będącego z swojej natury autokatalityczną reakcją łańcuchową i do wzrostu intensywności UBCL. Wyniki badań przeprowadzanych przy użyciu wysokoczułych stanowisk pomiarowych potwierdziły te przypuszczenia.

### *Badanie mrozo- i ciepłoodporności roślin*

Badania przeprowadzano najczęściej na roślinach etiolowanych ponieważ obecność chlorofilu mogła spowodować powstawanie luminescencji sensybilizowanej oraz fotosyntetycznej luminescencji chloroplastów.

W omawianych niżej pracach wykorzystano układy pomiarowe kwantometryczne, w których detektorami były wyselekcjonowane fotopowielacze FEU-42 mające w temperaturze pokojowej prąd ciemny ok. 20—30 imp/s.

Obiektami badanymi były korzenie i kielki kilku odmian pszenicy i jęczmienia. Pomiarzy przeprowadzono na kilkudziesięciu egzemplarzach 4—5-dniowych roślin, które wyrosły w ciemności w temperaturze ok. 24°C. Obniżenie temperatury powodowało zmniejszenie natężenia UBCL aż do tła. U odmian ciepłolubnych świecenie dochodziło do tła w wyższych temperaturach, natomiast u bardziej mrozoodpornych — w niższych. Przykładowo, odmiana pszenicy Monokokkum uprawiana w Azerbejdżanie wykazywała spadek UBCL do tła już w temperaturze +6°C, natomiast odmiana Kuncewskaja-45 uprawiana w rejonach centralnych ZSRR wykazywała spadek UBCL do tła w temperaturze +3°C. Dalsze ochładzanie powodowało wzrost natężenia UBCL, aż do osiągnięcia maksimum, po którym następował szybki spadek świecenia do poziomu tła. Przerwanie ochłodzenia w fazie wzrostu UBCL i ponowne ogrzewanie prowadziło do wzrostu natężenia świecenia o kinetyce podobnej do uprzedniego zaniku. Rośliny wykazywały sprawność procesów fizjologicznych co świadczyło o odwracalności ewentualnych uszkodzeń wywołanych niską temperaturą i sygnalizowanymi niskotemperaturowym wzrostem UBCL („krzykiem komórki“).

Ogrzewanie roślin po osiągnięciu niskotemperaturowego maksimum powodowało dalszy bardzo szybki wzrost UBCL, a u roślin można było zaobserwować w późniejszym okresie trwałe, nieodwracalne uszkodzenia, tzw. zwarzenie mrozem.

Położenie tego maksimum było różne dla różnych odmian. Dla jednej odmiany ciepłolubnej pszenicy maksimum UBCL wystąpiło w temp. —3°C, dla odmiany bardziej odpornej maksimum było wyraźnie wyższe i wystąpiło w temp. —5°C. Podobne korelacje zaobserwowano u różnych odmian jęczmienia.

Wzrost temperatury powoduje u zdrowych roślin umiarkowany wzrost natężenia UBCL w przybliżeniu spełniający równanie Arrheniusa. W temperaturach powyżej 30°C wzrost UBCL stawał się coraz bardziej szybki osiągając w temperaturze powyżej 40°C maksimum, po którym następował lokalny spadek natężenia świecenia i następnie ponowny szybki wzrost, aż do temperatury ok. 60°C powyżej której nie obserwuje się już zależności natężenia UBCL od temperatury. Na rys. 2 pokazano przykładowy przebieg zmian natężenia UBCL w zależności od zmian temperatury. Odstęp temperatur AB pomiędzy dwoma pikami („krzykami komórki“) pokrywa się z maksymalnym przedziałem temperaturowym, w którym jest możliwa wegetacja rośliny. Krzywa poniżej punktu A i powyżej punktu B obrazuje nieodwracalny spadek natężenia UBCL spowodowany naruszeniem autoregu-



lacyjnego aparatu kontrolującego proces utleniania lipidów strukturalnych. Ponowny wzrost natężenia świecenia w dalszej części obszaru BC spowodowany jest bezpośrednim zniszczeniem aparatu autoregulacji w rezultacie nieodwracalnych procesów denaturacyjnych przebiegających w martwej już komórce roślinnej. Powyżej punktu C obserwuje się stopniowe zmniejszanie natężenia świecenia spowodowane wyczerpywaniem się substratów. Badania wpływu temperatury na natężenie UBCL kielków zbóż przeprowadzane w naszym laboratorium wykazały nieco odmienne przebiegi charakteryzujące się powstawaniem temperaturowych pętli histerezy w całym zakresie badanych temperatur (Sławiński, Grabikowski i Milczarek 27).

Badano wpływ różnych stężeń sacharozy w pożywce na przesunięcie pików A i B. Stwierdzono, że sacharoza w stężeniach nietoksycznych przesuwają zakres AB w stronę temperatur niższych. Przesunięcie to jest tym większe, im większe stosowane jest stężenie sacharozy (od 0,125 M do 1,0 M). Podobne zjawisko stwierdzono i przy próżniowej infiltracji innych organicznych roztworów w nietoksycznych stężeniach (gliceryny i mocznika) (Agawierdiew, Doskocz i Tarusow 2, Agawierdiew i Tarusow 1, Doskocz i Coj 9, Agawierdiew i Tarusow 4).

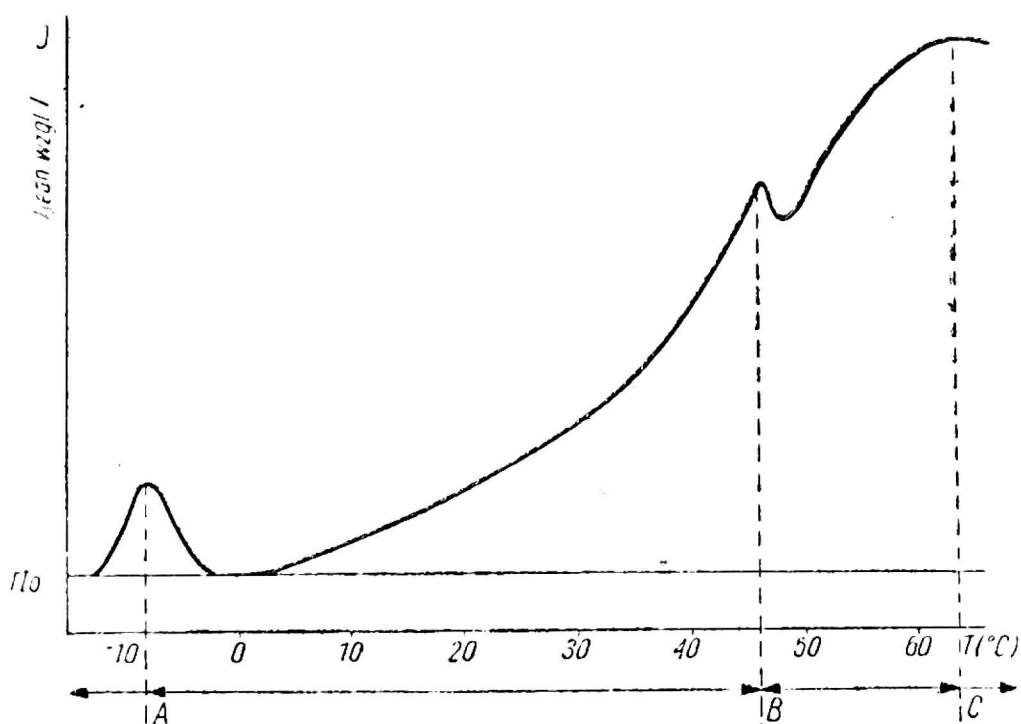
### *Badanie wpływu zasolenia na UBCL*

Badania przeprowadzono na 8—10-dniowych korzeniach grochu wyrosniętych w temp. ok. 22°C. Pomiarów były dokonywane metodą kwantometryczną przy użyciu wyselekcjonowanego fotopowielacza FEU-42. Korzenie grochu umieszczano w roztworach czterech różnych soli (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i CaCl<sub>2</sub>) o stężeniach 0,12; 0,25; 0,5; 1,0 M.

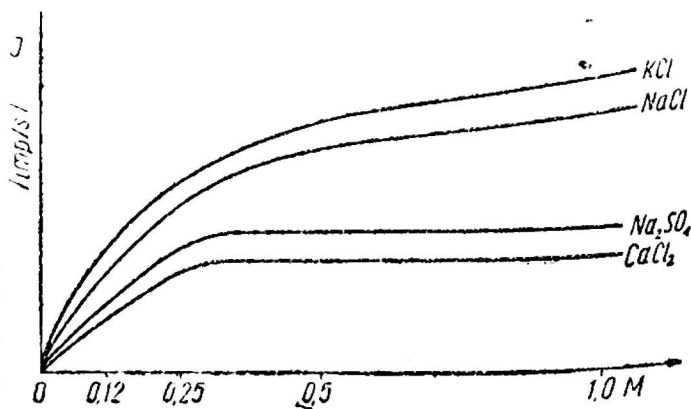
Stwierdzono zmniejszenie się ciepłoodporności roślin pod wpływem zasolenia. Wzrost krzywej I(T) (na rys. 2) jest mniejszy, a pik B pojawia się w niższej temperaturze. Charakterystyczne są wzrosty natężeń UBCL przy przeniesieniu roślin z roztworu do wody czystej. Najsilniejsza była reakcja roślin z roztworów KCl, nieco mniejsza z roztworów NaCl, a najmniejsze z roztworów Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i CaCl<sub>2</sub>. Zależność wzrostu natężenia UBCL od stężenia przedstawiono na rys. 3.

Zbadano także zależność wzrostu UBCL pod wpływem działania 0,25 M NaCl na kielki w różnym wieku od 2 dni do 14 dni. Z pomiarów wynikało, że z wiekiem wrażliwość kielków na plazmolizę wywołaną roztworami hipertonicznymi malała. Miarą odporności rośliny na działanie roztworu soli jest wielkość przyrostu natężenia UBCL przy przeniesieniu do czystej wody. Dopływ wody do wnętrza komórek, w których uprzednio zaszła plazmoliza, wywołuje przyspieszenie procesów utleniania i jednocześnie wzrost zapotrzebowania na lipidowe antyutleniacze. Im bardziej sprawny system anty-

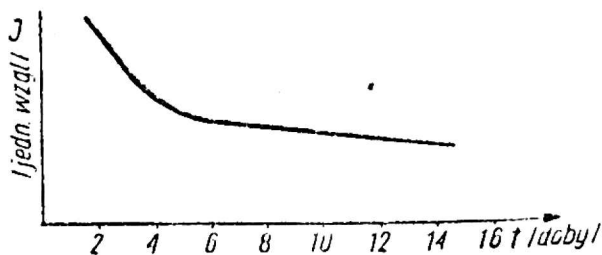
utleniający, tym większa odporność i mniejszy wzrost natężenia UBCL (Coj, Wiesielowski i Tarusow 6).



Rys. 2. Przykładowy przebieg zmian natężenia UBCL w funkcji zmian temperatury. Objaśnienie w tekście



Rys. 3. Wykresy zmian przyrostów natężenia UBCL uzależnionych od stężeń czterech soli nieorganicznych (wg. Coj, Wiesielowski i Tarusow)

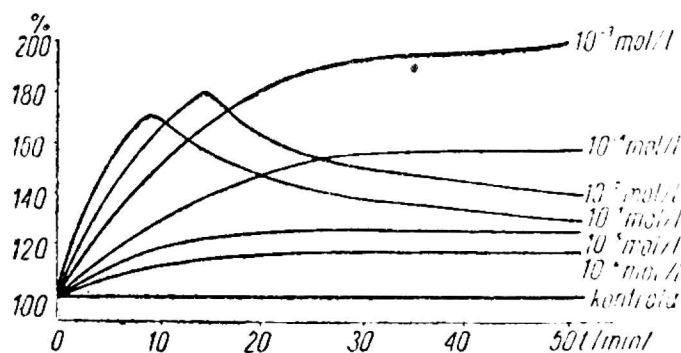


Rys. 4. Zmiana wielkości wzrostu UBCL w funkcji wieku kiełków (wg. Coj, Wiesielowski i Tarusow)

## Badanie wpływu herbicydów na UBCL

Badania przeprowadzono na kielkach ryżu odmiany Krasnodarska 424 oraz prosa ryżowego w fazie 2-3 listków, które wyrastały w temperaturze 20—22°C. Pomiary przeprowadzono na kwantometrycznym stanowisku pomiarowym przy użyciu wyselekcjonowanego fotopowielacza FEU-42. Sygnał od obiektów mierzonych przewyższał tło ok. 10 razy. Na system korzeniowy ryżu i prosa ryżowego działano herbicydem „jalana” i 2—4-D w róż-

Rys. 5. Wpływ różnych koncentracji herbicydu „jalana” na wzrost natężenia UBCL kielków ryżu (wg Coj, Aleszin, Ziemanaja i Agarkow)

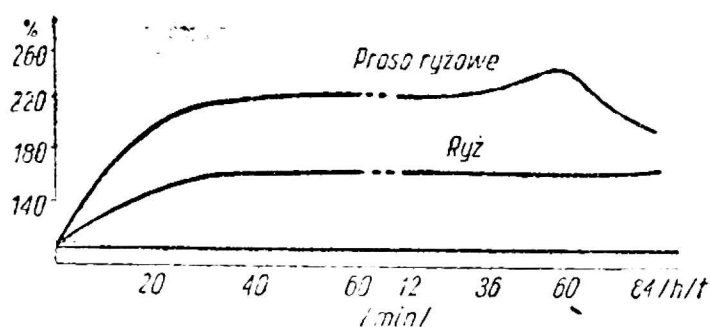


nych stężeniach. Wykres zmian natężenia UBCL w funkcji czasu działania dla różnych koncentracji herbicydów podano na rys. 5. W pierwszym okresie po kontakcie korzeni z herbicydem natężenie UBCL zwiększa się w przybliżeniu proporcjonalnie do wzrostu stężenia czynnika toksycznego. Dla małych stężeń ( $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  mol/l) stosunkowo szybko ustala się stacjonarny poziom świecenia nie wiele przewyższający swoim natężeniem świecenie próbki kontrolnej (15 i 25%). Dla większych stężeń, stacjonarne świecenie ustalało się na znacznie wyższym poziomie.

Wzrost natężenia UBCL jest spowodowany naruszeniem wewnętrznych mechanizmów regulujących prędkość utleniania lipidów strukturalnych w błonach komórkowych. Ustalenie się stanu równowagi świadczy o wzmożeniu transportu inhibitorów, utleniania lipidów, kompensującego zwiększone zapotrzebowanie. Zadziałanie na układ korzeniowy ryżu dużymi stężeniami ( $10^{-2}$  i  $10^{-1}$  mol/l) powoduje szybki wzrost natężenia UBCL i następnie jego inhibitowanie. Można tu zaobserwować uzależnienie szybkości wzrostu i szybkości zaniku od wielkości stężenia herbicydu. Inhibitowanie procesu wzrostu natężenia UBCL można tłumaczyć wstrzymaniem procesów życiowych w komórce oraz nagromadzeniem się produktów utleniania związków fenolowych tłumiących biochemiluminescencję. Produkty utleniania, którymi są nadtlenki i rodniki nadtlenkowe są również bardzo toksyczne i mogą przyspieszyć śmierć organizmu.

Ciekawe jest porównywanie oddziaływania herbicydu w koncentracji  $10^{-4}$  mol/l na kielki ryżu i prosa ryżowego. Przedstawiają to wykresy na rys. 6. Dla ryżu stężenie  $10^{-4}$  mol/l jest nietoksyczne ponieważ po przejś-

ciowym wzroście natężenia UBCL ustala się na stacjonarnym poziomie co jest cechą charakterystyczną dla normalnie funkcjonujących organizmów. Dla prosa ryżowego to samo stężenie jest toksyczne, ponieważ ustalenie sta-



Rys. 6. Wpływ herbicydu w koncentracji  $10^{-4}$  mol/l na UBCL kiełków ryżu i prosa ryżowego (wg Coj, Aleszin, Ziemiałaja i Agarkow)

cjonarnego świecenia następuje na zbyt wysokim poziomie, obserwowany po dwóch dobach jego szybki spadek świadczący o nieodwracalnym uszkodzeniu struktury błon komórkowych. Uszkodzenia takie zahamowują transport elektronów w łańcuchu oddechowym i uniemożliwiają funkcjonowanie metabolizmu na poziomie komórkowym co musi doprowadzić do śmierci całej rośliny.

Jak z powyższego widać UBCL można wykorzystać do szybkiej oceny toksyczności różnych herbicydów tak dla roślin uprawnych jak i dla chwastów. Już kilkudniowe obserwacje oddziaływań herbicydów pozwalają określić minimalne stężenie będące jednocześnie letalnym dla chwastów jak i subletalnym dla chronionej rośliny uprawnej (Coj, Aleszin, Ziemiałaja i Agarkow 7).

Z przedstawionych trzech wybranych kierunków badań nad wykorzystaniem UBCL w praktyce rolniczej widać, że można świecenie biologiczne żywych tkanek traktować jako czuły test nadający się do szybkiej oceny odporności roślin na ekstremalne czynniki zewnętrzne, określać zdolności adaptacyjne w zmienionych i nieoptymalnych warunkach wegetacji, badać energetykę układów komórkowych i subkomórkowych, śledzić w sposób wygodny i nieniszczący transport egzogennych substancji używanych do ochrony i hodowli roślin, a także i innych nie wymienionych aspektów diagnostyki rolniczej będących w fazie badań i opracowań metodycznych.

Zastosowanie UBCL nie jest jedyną z nowych metod biofizycznych wykorzystywanych w biologii i rolnictwie. Należałoby wymienić jeszcze pomiary biopotencjałów, przewodnictwa elektrolitycznego, chemiluminescencji całych roślin i nasion a także ich homogenatów, elektrochemiluminescencję, a przede wszystkim fotosyntetyczną luminescencję chloroplastów. Wymienione ostatnie trzy metody należą także do grupy metod posługujących się detekcją ultrasłabych i słabych świeceń.

Szczególnie przydatna wydaje się być metoda wykorzystująca pomiary fotosyntetycznej luminescencji ponieważ świecenie to ściśle związane z funkcjonowaniem aparatu fotosyntetycznego; a pośrednio i ze stanem fizjologicznym kompleksu lipidowo-białkowego membran komórkowych, może dać większość informacji uzyskiwanych na drodze detekcji UBCL oraz dodatkowe związane bezpośrednio z naruszeniem procesu fotosyntezy. Metoda detekcji fotosyntetycznej luminescencji i jej wykorzystanie w rolnictwie wymaga szerszego omówienia i dlatego zostanie przedstawiona w przygotowywanej publikacji.

Mimo że te najnowsze zdobycze biofizyki stosowanej nie wyszły poza skalę póllaboratoryjną, a w naszym kraju w ogóle są bardzo mało znane, można już dziś przewidzieć szerokie ich zastosowanie w tak ważnych dla naszej gospodarki gałęziach produkcji jakimi są: rolnictwo, warzywnictwo i sadownictwo.

#### LITERATURA

1. Agawierdiew A. S., Tarusow B. N.: *Biofizika*, t. X, Nr 2, 1965.
2. Agawierdiew A. S., Doskocz J. E., Tarusow B. N.: *Biofizika*, t. X, Nr 4, 1965.
3. Agawierdiew A. S., Doskocz J. E., Tarusow B. N.: *DAN SSSR*, t. 163, Nr 4, 1965.
4. Agawierdiew A. S., Tarusow B. N.: *Biofizika*, t. XVIII, Nr 1, 1973.
5. Awierjanow A. A., Pogosjan S. I., Korieckaja T. F., Cej A. A., Wiesielowski W. A., Tarusow B. N.: *Tezy IV Internat. Biophys. Congress. M. Abstr.*, EXXYa 4/2 s. 420, 1972.
6. Coj K. M., Wiesielowski W. A., Tarusow B. N.: *DAN SSSR*, t. 176, Nr 4, 1967.
7. Coj K. M., Aleszin E. P., Ziemiałanaja T. F., Agarkow W. D.: *DAN SSSR*, t. 204, Nr 6, 1972.
8. Colli L., Facchini V.: *Nuovo Cimento*, 11, 255, 1954.
9. Doskocz J. E., Coj K. M. *Naucz. dokł. wyższej szkoły. Biologicz. nauki*, Nr 4, 1968.
10. Khan A. U., Kasha M.: *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 88, s. 1574, 1966.
11. Koniew S. W., Troitsky N. A., Katibnikow M. A.: *V Internat. Biochem. Congress. Minsk*, 1961.
12. Kruk I., Sławińska D.: *IV Internat. Biophys. Congress. M. Abstr.*, E16 1/7, s. 52, 1972.
13. Lee J., Seliger H. H.: *Photochem. Photobiol.*, vol. 4, s. 1015, 1965.
14. Mamiedow T. G., Popow G. A., Koniew W. W.: *DAN SSSR*, t. 187, Nr 4, 1969.
15. Mamiedow T. G., Popow G. A., Koniew W. W.: *Swierchslabyje swiezczenija w medicinie i sielskomchozjajstwie. IV Simpoz. Moskwa, Tezisy* s. 52, 1971.
16. Mamiedow T. G., Popow G. A., Koniew W. W.: *IV Internat. Biophys. Congress. M. Abstr.*; E16 1/9, s. 53, 1972.

17. Marenkow W. S.: IV Internat. Biophys. Congress. M. Abstr., EXXIIIa 3/7, s. 369, 1972.
18. Mc Elroy W. D., Seliger H. H.: „Light and life”, Baltimore, s. 219—257, 1961.
19. Petruszewicz J. M., Konopliannikow A. G.: Biofizika, t. X, Nr 3, 1965.
20. Poliwoda A. I.: IV Internat. Biophys. Congress, M. Abstr., EXXIIIa I/II, s. 27, 1972.
21. Sławińska D., Sławiński J.: a). IV Internat. Biophys. Congress. M. Abstr., EI6 1,6, s. 51, 1972.
22. Sławińska D., Sławiński J.: b). Internat. Conf. Chemiluminescence, Athens USA, Abstr, 1972.
23. Sławiński J.: Post. Bioch., vol. 13, s. 191, 1967.
24. Sławiński J.: Kosmos, ser. A. 1, s. 3, 1969.
25. Sławiński J.: Rola polifenoli i chinonów w chemiluminescencji modelowych układów biologicznych, WSR Szczecin, 1969.
26. Sławiński J., Grabikowski E., Murkowski A.: Zesz. Nauk. WSR Szczecin, Nr 37, 1971.
27. Sławiński J., Grabikowski E., Milczarek I.: Zesz. Nauk. A. R. Szczecin (w druku), 1973.
28. Stauff J., Reske G.: Naturwissenschaften, vol. 51, Nr 2, 1964.
29. Stauff J.: Photochem. Photobiol., vol. 4, s. 1199—1205, 1965.
30. Steele R. H. i wsp.: Internat. Conf. Chemiluminescence, Athens USA, Abstr, 1972.
31. Tarusow B. N., Iwanow I. I., Poliwoda A. N., Żurawlow A. I.: Biofizika, vol. 6, Nr 4, s. 490, 1961.
32. Tarusow B. N., Żurawlew A. I.: „Bioluminescencja” Trudy MOJP. M., Izd-wo „Nauka”, 1965.
33. Tarusow B. N.: Priroda, Nr 2, s. 11, 1966.
34. Tarusow B. N., Iwanow I. I., Petruszewicz J. M.: Swierchslabyje swieczzenia w biologiczeskich sistiemach. M. Izd. Mosk. Gosud. U-ta, 1967.
35. Wiesielowski W. A., Dżanumow D. A.: Swierchslabyje swieczzenia w medycynie i sielskomchozjajstwie. IV Simpoz. M. Tezisy, s. 38, 1971.
36. Władimirow J. A., Lwowa O. F.: Biofizika kletki. Mosk. s. 74, 1965.
37. Władimirow J. A.: 1966, Swierchslabyje swieczzenia pri biochemiczeskich reakcjach. Moskwa.
38. Vassil'ev R. F., Vichutinsky A. A.: Nature, vol. 194, s. 1276, 1962.
39. Żurawlew A. I., Filipow J. N., Simonow B. B.: Biofizika, t. 10, s. 246, 1965.