

## ŚWIECENIA BIOLOGICZNE

*A. Brzóstowicz*

Zakład Fizyki, Akademia Rolnicza, ul. Papieża Pawła VI nr 3, 71-459 Szczecin

e-mail: fizyka@dedal.man.szczecin.pl

**Streszczenie:** W pracy scharakteryzowano pojęcie luminescencji układów biologicznych i przedstawiono próbę jej klasyfikacji a także omówiono idee pomiaru. Ponadto omówiono informacyjną rolę luminescencji i możliwości jej zastosowania w biologii, rolnictwie i ochronie środowiska.

**Słowa kluczowe:** luminescencja; układy pomiarowe, informacyjna rola.

### POJĘCIE LUMINESCENCJI

Luminescencja to zjawisko emisji promieniowania elektromagnetycznego o natężeniu większym od promieniowania cieplnego w danej temperaturze i o czasie trwania dłuższym od okresu drgań emitowanej fali świetlnej. Luminescencją nazywa się także promieniowanie emitowane w procesie luminescencyjnym.

Luminescencja powstaje podczas przejść promienistych, w trakcie których cząsteczka wzbudzona ( $M^*$ ) traci energię, emitując foton ( $h\nu$ ). Przechodzi ona wtedy do stanu podstawowego ( $M$ )



gdzie:  $h$  - stała Plancka;  $\nu$  - częstotliwość fali

albo do niższego stanu wzbudzonego



i w kolejnej emisji do stanu podstawowego



Wzbudzenie cząsteczek natomiast może odbywać się różnymi sposobami:

1) przez pochłanianie energii



2) przez wytworzenie cząsteczki wzbudzonej podczas reakcji innych cząsteczek



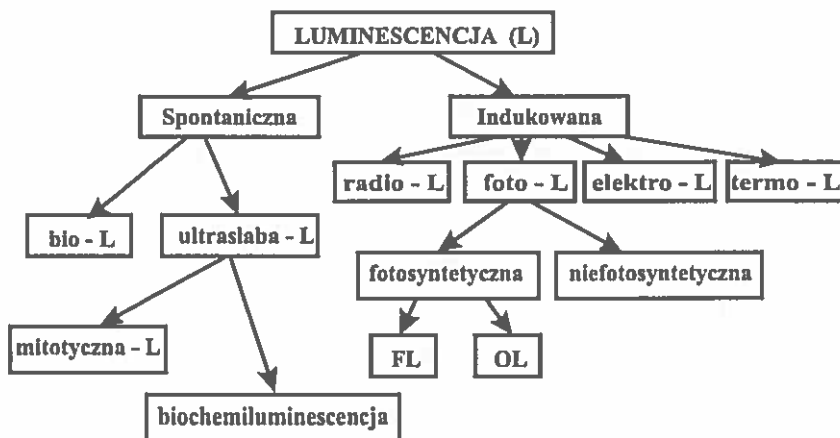
3) przez przekazanie wzbudzenia (energii) między cząsteczkami



W układach wielocząsteczkowych i tak skomplikowanych jakimi są układy biologiczne, przekazywanie wzbudzenia może odbywać się pomiędzy wieloma cząsteczkami jak i całymi kompleksami związków chemicznych tworzących tkanki roślinne czy zwierzęce.

#### KLASYFIKACJA ŚWIECENÍ BIOLOGICZNYCH

W badaniach promieniowania żywych organizmów można wyróżnić trzy nurty [21, 22] (Rys.1):



Rys.1. Podział luminescencji (L) ze względu na sposób wzbudzenia.

Fig.1. Classification of luminescence with regard to the means of induction.

- a) Jeden dotyczy bioluminescencji, czyli spontanicznego świecenia dostrzegalnego wzrokiem, niektórych gatunków zwierząt i niższych roślin powstającego w wyniku enzymatycznego utleniania w organizmach specyficznych substancji (np. lucyferyna utleniana tlenem molekularnym w obecności lucyferazy).
- b) Drugi nurt dotyczy badań ultrasłabej luminescencji czyli spontanicznej emisji o bardzo małym natężeniu. Intensywność oraz inne parametry tej emisji zmieniają się podczas podziału i śmierci komórki stresu i choroby. Świecenie to powstaje m.in. w wyniku procesów związanych z reakcjami utleniania lipidów błon biologicznych.
- c) Trzeci nurt dotyczy badań emisji indukowanych różnymi czynnikami fizykochemicznymi. Należą do nich m.in. światło (FL - fluorescencja, OL - opóźniona luminescencja), promieniowanie jonizujące, pole elektryczne, czynniki mechaniczne.

#### INFORMACYJNA ROLA LUMINESCENCJI

Układy do pomiarów luminescencji dają zwykle wyniki w postaci pewnej liczby zliczeń, która jest proporcjonalna do ilości emitowanych fotontów, a ta z kolei do ilości emitowanych cząsteczek [9, 15,24]. Dzieląc liczbę zliczeń przez czas pomiaru uzyskuje się intensywność emisji a dzieląc jeszcze przez pole powierzchni (lub masę) badanego obiektu uzyskuje się świecenie z jednostki powierzchni (lub z jednostki masy).

Pomiary luminescencji można dokonywać w funkcji następujących parametrów:

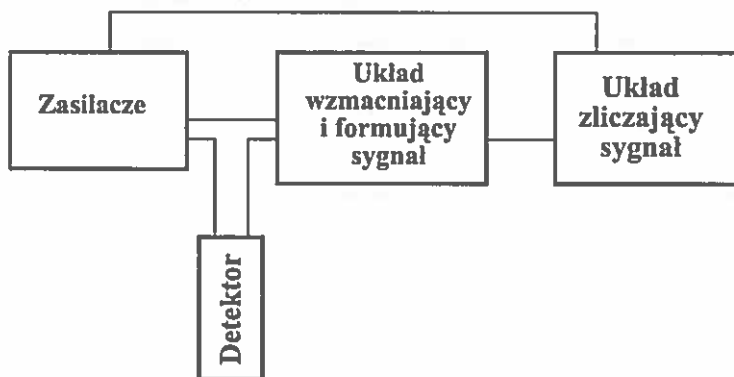
- a) czasu pomiaru (procesu, reakcji)  
(uzyskuje się informacje o kinetyce procesów i stałych szybkości, a przez to o ilości procesów i szybkości ich przebiegu)
- b) czasu próbkowania  
(prawdopodobieństwo rozkładu statystycznego emisji, złożoność procesu, spójność czasowa)
- c) długości fali  
(widmo emisji, energetyka procesu)
- d) napromieniowania UV, VIS  
(fotoinhibicja, fotodestrukcja)
- e) temperatury

- (energetyka reakcji, energia aktywacji, zdolności termoadaptacyjne, termo-  
odporność)
- f) deficytu wody  
(odporność na suszę)
- g) stężenia reagentów  
(odporność na czynniki chemiczne - krzywe kalibracji)

## UKŁADY POMIAROWE

### Ogólny układ detekcyjny

Układ do pomiarów luminescencji (Rys.2) składa się z detektora, zasilaczy, układów wzmacniających, formujących i zliczających sygnał. Detektorem w tych układach bywa fotopowielacz lub fotodioda. Czułość spektralna fotodetektorów musi być dobrana w zależności od intensywności badanej luminescencji oraz widma emisji. Najczulsze fotodetektory muszą być do pomiarów spontanicznej ultrasłabej biochemiluminescencji, której natężenie jest o kilka rzędów wielkości mniejsze od np. fluorescencji chlorofilu.



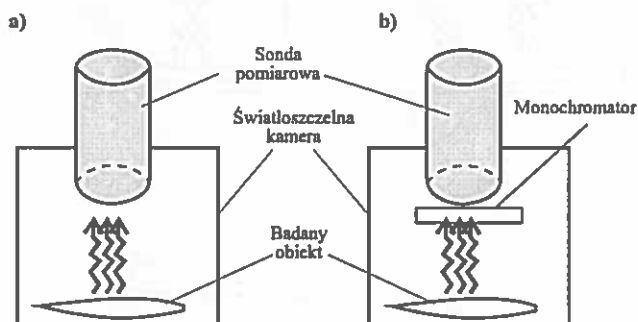
Rys.2. Schemat blokowy układu do detekcji luminescencji.

Fig.2. Block diagram of the measuring system of the luminescence.

Detektor umieszczany jest w tzw. sondzie pomiarowej, która znajduje się w światłoszczelnej kamerze pomiarowej (Rys.3, 4, 5, 6).

### Układ do detekcji spontanicznej luminescencji

Oprócz wspomnianego układu detekcyjnego (Rys.2) stanowisko pomiarowe musi zawierać światłoszczelną kamerę, do której wprowadza się badany obiekt biologiczny (fragmenty rośliny) oraz sondę pomiarową, w której znajduje się detektor luminescencji (Rys.3a). Jeśli przedmiotem badań jest widmo emisji wówczas przed fotopowielaczem musi znaleźć się monochromator (Rys.3b).



Rys. 3. Schemat blokowy układów do badania spontanicznej luminescencji:

a) najprostszy układ, b) układ z monochromatorem.

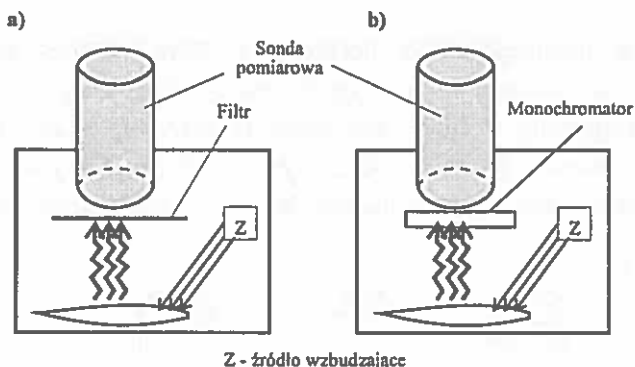
Fig.3. Block diagram of the measuring systems of the spontaneous luminescence

a) the most simple system, b) the system with monochromator.

Rzeczywiste rozwiązania techniczne układów do badania spontanicznej luminescencji przedstawiono w wielu pracach [10,11,21,23].

### Układ do pomiaru indukowanej luminescencji

Układ do pomiaru indukowanej luminescencji jest podobny do układu pomiarowego do spontanicznej luminescencji z tą różnicą, że musi zawierać jeszcze źródło wzbudzające dany rodzaj luminescencji. Jeśli badaczka nie interesuje widmo luminescencji wystarczy w kamerze odpowiedni filtr zabezpieczający fotodetektor (Rys.4a), natomiast do pomiarów widma niezbędne jest zastosowanie monochromatora (Rys.4b).



Rys.4. Schemat blokowy układów do pomiaru indukowanej luminescencji:

a) układ najprostszy, b) układ z monochromatorem.

Fig.4. Block diagram of the measuring systems of the induction luminescence:

a) the most simple system, b) the system with monochromator.

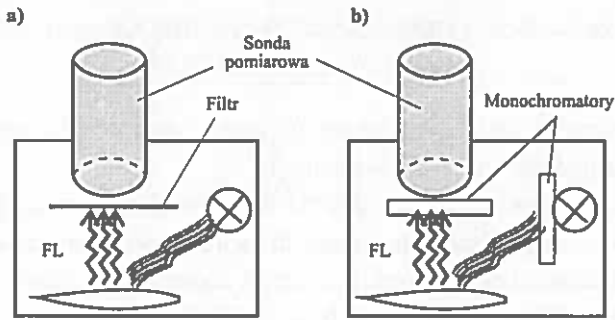
### Układ do badania fotoindukowanej luminescencji (fotoluminescencji)

Spośród różnego rodzaju indukowanych luminescencji z układów biologicznych największy rozwój i zastosowanie znalazły pomiary fotoluminescencji (fluorescencja i opóźniona luminescencja). Stanowisko pomiarowe musi być więc zaopatrzone w źródło światła, które będzie wzбудzało fotoluminescencję.

#### *Układ do pomiaru fluorescencji*

Pomiary fluorescencji (Rys.5) można wykonywać na obiektach adoptowanych do ciemności (przed pomiarem) wówczas rejestruje się tzw. indukcję fluorescencji, natomiast jeżeli badane obiekty przed pomiarem są oświetlane wówczas rejestruje się tzw. fluorescencję stacjonarną.

Różne rozwiązania techniczne przedstawionej idei pomiarów fluorescencji omawiano w wielu pracach [6,8,14,16,20].



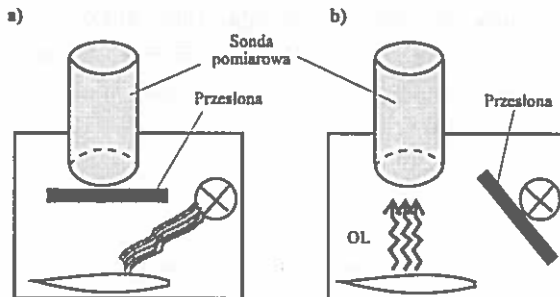
Rys.5. Schemat blokowy układów do pomiaru fluorescencji: a) najprostszy układ, b) układ z monochromatorami umożliwiający badanie zarówno widma emisji, jak i widma wzbudzenia.

Fig.5. Block diagram of the measuring systems of the fluorescence: a) the most simple system, b) the system with monochromators giving possibility of emission spectrum as well as photoactivation spectrum investigation.

#### *Układ do pomiaru opóźnionej luminescencji*

Aby rejestrować opóźnioną luminescencję należy w kamerze zamontować odpowiednie przesłony umożliwiające zasłonięcie fotodetektora podczas wzbudzenia i zasłonięcie źródła wzbudzającego podczas pomiaru (Rys.6). W przypadku badania widma emisji czy widma wzbudzenia należy zastosować jeszcze odpowiednie monochromatory przed fotodetektorem i pomiędzy źródłem wzbudzenia a obiektem badanym.

Różnorodność rozwiązań technicznych przedstawionej zasady pomiaru opóźnionej luminescencji prezentowano w wielu pracach [3,4,8,17,18,19].



Rys.6. Schemat blokowy układu do badania opóźnionej luminescencji:

a) fotowzbudzenie, b) pomiar.

Fig.6. Block diagram of the measuring system of the delayed luminescence:

a) photoactivation, b) detection.

## ZASTOSOWANIE LUMINESCENCJI W BIOLOGII, ROLNICTWIE I OCHRONIE ŚRODOWISKA

Spośród metod luminescencyjnych najczęściej zastosowań znalazły pomiary ultrasłabej i fotoindukowanej luminescencji.

Ultrasłaba biochemiluminescencja (UBCL) może być uważana za wskaźnik biohomeostazy. UBCL daje informacje nt. sprawności bioenergetyki oraz niewydolności mechanizmów ochronnych przed rodnikowymi reakcjami utleniania a także pośrednio informacje o stanie błon biologicznych zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych.

Pomiary UBCL są stosowane w badaniach zdolności kiełkowania zarodników grzybów i nasion roślin uprawnych [10], wytrzymałości systemu korzeniowego na zasolenie i suszę glebową, odporności roślin na infekcję grzybową, wirusową czy bakteryjną. Ponadto UBCL stosowano do oceny uszkodzeń mechanicznych ziarna [23] oraz do badania wpływu przemrażania i rozmrażania liści na stan błon komórkowych [11].

Fotoluminescencja (fluorescencja, opóźniona luminescencja) chlorofilu żywych fragmentów roślin może być traktowana jako wskaźnik sprawności aparatu fotosyntetycznego, a w szczególności sprawności transportu elektronowego w początkowych reakcjach fotosyntezy. Fotoluminescencja pośrednio informuje o stanie błon tylakoidalnych. Pomiary indukcji fluorescencji dają informację o stanie roślin podczas uruchamiania fotofizycznych reakcji fotosyntezy a pomiary OL podczas jej trwania.

Pomiary fluorescencji i opóźnionej luminescencji służą do badania początkowych reakcji fotosyntezy i wpływu na nie różnych czynników fizykochemicznych takich jak: ekstremalna temperatura, susza, herbicydy, zasolenie, silne napromieniowanie UV oraz VIS, retardanty wzrostu, deficyt nadmiar składników mineralnych, metale ciężkie, ozon, obniżone i podwyższone stężenie CO<sub>2</sub> [1,2,5,7,12,13,14,18,20].

## PIŚMIENNICTWO

1. **Brzóstowicz A.:** Evaluation of frost resistance of rape using luminescence measurements. W: Proceedings of the 7-th International Rapeseed Congress, Poznań 11-14. 05. 1987, 4, 837-842, 1987
2. **Brzóstowicz A.:** Evaluation of cereal frost resistance by luminescence method. *Hod. Roś. Aklimat. i Nasien.* 32, 1/2, 191-194, 1988.



3. Brzóstowicz A.: Mikrokomputerowy zestaw do badania wpływu temperatury na natężenie opóźnionej luminescencji fragmentów liści. Zesz. Nauk. AR Szczecin, 159 Rolnictwo, Ser. Techn. z. 56, 41-47, 1993.
4. Brzóstowicz A., Murkowski A.: Kwantometryczne urządzenie do oceny mrozoodporności zbóż ozimych. Zesz. Nauk. AR w Szczecinie, Rolnictwo XLII, Seria Techniczna, 129, 3-8, 1987.
5. Brzóstowicz A., Maćkowiak W., Szelaż J.: Ocena mrozoodporności rodów i odmian pszenżyta. Biuletyn Inst. Hod. i Aklimat. Roślin, 168, 21-24, 1988.
6. Brzóstowicz A., Prokowski Z.: Zestaw pomiarowy do badania fluorescencji tkanek roślinnych w funkcji temperatury. Zesz. Nauk. AR Szczecin nr 145 Rol. Ser. Przyn. z.49, 57-62, 1991.
7. Clement J.M., Van Hasselt P.R.: Chlorophyll fluorescence as a parameter for frost hardiness in winter wheat: A comparison with other hardiness parameters, *Phyton* 36 (1), 45-56, 1996.
8. Gaevskii N. A., Morgun V. N.: Ispolzovanie peremennoi i zamedlennoi fluorescencii chlorofilla dla izučeniia fotosinteza rasteni. *Fiziol. Rast.* 40 (1), 136-145, 1993.
9. Govindjee, Ames J., Fork D.Ch. /ed./: Light emission by plants and bacteria. Academic Press, INC (London) Ltd. 1986.
10. Grabikowski E., Brzóstowicz A., Prokowski Z., Murkowski A.: Badanie żywotności nasion metodą ultrasłabej luminescencji. *Post. Fiz. Med.* 17 (3/4), 109-120, 1982.
11. Grabikowski E., Brzóstowicz A., Murkowski A., Prokowski Z.: Badanie wpływu stresu temperaturowego na rośliny przy pomocy ultrasłabej biochemiluminescencji. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 351, 35-40, 1988.
12. Hideg E., Kobayashi M., Inaba H.: The far red induced slow component of delayed light from chloroplasts is emitted from Photosystem II, *Photosynth. Res.* 29, 107-112, 1991.
13. Kaczmarek J., Prokowski Z., Brzóstowicz A.: Low temperature effects on fluorescence in leaves of unhardened and hardened winter wheat. *Photosynthetica*, 25(2), 215-217, 1991.
14. Krause G.H., Weis E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349, 1991.
15. Lavorel J.: Luminescence. W: Govindjee /ed./, *Bioenergetics of photosynthesis*, New York, Academic Press, 223-317, 1975.
16. Lichtenthaler H.K., Rinderle U.: The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19 (Suppl. 1), S29-S85, 1988.
17. Morgun V.N., Grigor'ev Yu. S., Gekhman A.V.: The relation of light-induced changes of chlorophyll delayed fluorescence and CO<sub>2</sub> fixation of plants. *Photosynthetica* 26 (4), 571-577, 1992.

18. Murkowski A., Brzóstowicz A., Grabikowski E., Prokowski Z.: Luminescencyjna metoda bioindykacji fitotoksycznych zanieczyszczeń środowiska. *Post. Fiz. Med.* 17, 3/4, 85-91, 1982
19. Prokowski Z., Brzóstowicz A., Grabikowski E., Murkowski A.: Wykorzystanie fotoindukowanej luminescencji do ilościowego określania biomasy fitoplanktonu. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.*, 351, 41-48, 1988.
20. Schreiber U., Bilger W.: Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements, Tenhunen J.D. et al. /ed./, NATO ASI Series G 15, 27-53, 1987.
21. Sławiński J.: Metody badania słabych emisji fotonowych z układów biologicznych, W: Twardowski J./ed./, *Biospektroskopia* 3, PWN, Warszawa, 107-214, 1989.
22. Suppan P.: *Chemia i światło*, Wyd. Nauk. PWN Sp. z o.o., Warszawa, 1997.
23. Tryka S., Koper R., Grundas S.: Badanie wpływu uszkodzeń mechanicznych ziarna pszenicy o zróżnicowanym typie struktury na natężenie ultrasłabej biochemiluminescencji, *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 354, 177-183, 1989.
24. Veselovskii V. A., Veselova T. V.: *Luminescencia rasteni*, Moscov, Nauka, 1990.

## BIOLOGICAL EMISSION

*A. Brzóstowicz*

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

**Summary:** The luminescence of biological systems and the trial of their classification are shown in this work. There are also shown the methods of luminescence measurements. What is more informative role and possibility of using in biological, agriculture and environment protection are discussed.

**Keywords:** luminescence; measurement systems, informative role.