

**Wpływ promieniowania jonizującego na kondycję roślin zimozielonych
na przykładzie żywotnika zachodniego (*Thuja Occidentalis*)**

**The influence of ionizing radiation on the condition of evergreen plants in the case
of *Thuja Occidentalis***

Maciej Sarnek, Przemysław Szopa, Jacek Czerniak, Andrzej Gajewski
Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie.

Wydział: Towaroznawstwa, Katedra: Metrologii i Analizy Instrumentalnej

Streszczenie

W artykule poruszono kwestię przydatności żywotnika zachodniego (*Thuja Occidentalis*) jako biowskaźnika w przypadku skażenia spowodowanego promieniowaniem jonizującym. W tym celu rośliny naświetlono radioaktywnym izotopem sodu ^{22}Na , a po ekspozycji przeprowadzono analizę emisji fluorescencji pochodzącej od wzbudzenia chlorofilu całkowitego w zależności od czasu narażenia roślin na promieniowanie. Analizę przeprowadzono metodą spektrofluorymetryczną. Stwierdzono, że w wyniku narażenia badanej rośliny na promieniowanie jonizujące następuje uszkodzenie chlorofilu całkowitego, a co za tym idzie, żywotnik zachodni może być traktowany jako biowskaźnik w przypadku skażenia środowiska promieniowaniem jonizującym.

Słowa kluczowe

Promieniowanie jonizujące, chlorofil, fluorescencja, rośliny zimozielone

Abstract

The article poses a question of the suitability of the American Arborvitae (*Thuja Occidentalis*) as a biomarker in case of contamination of chlorophyll cause by ionizing radiation. Before the analysis the samples were irradiated by ^{22}Na positron source. After

the exposures the samples were analyzed using the spectrofluorescence method. In the method, fluorescence emission comes from the excitation of chlorophyll. Our results showed that an irradiation can lead to damage of chlorophyll content. Therefore *Thuja Occidentalis* can be treated as a biomarker for ionizing radiation.

Keywords

Ionizing radiation, chlorophyll, fluorescence, evergreen plants

1. Wprowadzenie

Promieniowanie elektromagnetyczne to rozchodzące się w przestrzeni zaburzenie pola elektromagnetycznego. Składowe pochodzące od pola elektrycznego i magnetycznego wzajemnie się indukują. Nośnikiem oddziaływania elektromagnetycznego z punktu widzenia mechaniki kwantowej i teorii modelu standardowego jest kwant energii nieposiadający ładunku elektrycznego oraz momentu magnetycznego o masie spoczynkowej równej zero wykazujący dualizm korpuskularno-falowy. W zależności od energii tych kwantów, promieniowanie, na które się składają, zmienia swoje własności. Im wyższa energia, tym promieniowanie jest bardziej przenikliwe i szkodliwe, w szczególności promieniowanie gamma γ .

Biologicznymi skutkami takiego promieniowania jest jonizacja i wzbudzenie atomów w żywych komórkach [Siemiński 1994]. Powstają wówczas bardzo aktywne chemicznie rodniki, jony lub zjonizowane grupy atomów, które w istotny sposób wpływają na przebieg procesów chemicznych zachodzących w żywej komórce. Pewne składniki komórek są zmieniane lub uszkodzane, a uszkodzone produkty działają toksycznie. Z kolei radiolityczne działanie rozkładowe promieniowania powoduje przemianę zwykłej wody, która stanowi podstawowy składnik tkanek, i może zmienić nawet cały jej chemizm [Běhounek, Bohun, Klumpar 1962].

Celem badań było wykazanie, w jakim stopniu wysokoenergetyczne promieniowanie gamma wpływa na niszczenie żywych komórek w roślinach zimozielonych oraz sprawdzenie, czy *Thuja Occidentalis* może służyć jako biowskaźnik w przypadku skażenia środowiska promieniowaniem jonizującym.

2. Przedmiot i metodyka badań

Badaniom poddano gałązki żywotnika zachodniego (rys.1), rośliny należącej do rodziny cyprysowatych. Jest to gatunek rosnący na terenach nizinnych w klimacie chłodnym i wilgotnym. Ze względu na niewysokie wymagania i dużą żywotność krzew ten jest bardzo popularny w Polsce i należy do najczęściej sadzonych roślin w ogrodach.

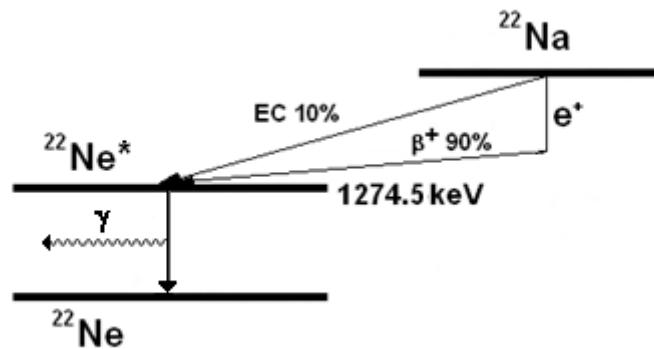


Rys. 1. Żywotnik zachodni (*Thuja Occidentalis*)

Próbki *Thuja Occidentalis* przeznaczone do badań pobrano z terenów wiejskich nieskażonych pyłami i zanieczyszczeniami pochodzącym ze spalania paliw kopalnych. Badanie przeprowadzono w dwóch etapach. Pierwszy etap miał na celu narażenie gałązek żywotnika zachodniego na promieniowanie gamma, drugi polegał na zmierzeniu widma emisji fluorescencji całkowitego chlorofilu zawartego w gałązkach.

W badaniu wykorzystano radioaktywny izotop sodu ^{22}Na o czasie połowicznego rozpadu 2,62 roku, w którym na skutek oddziaływań słabych w niestabilnym jądrze następuje przemiana protonu w neutron i w konsekwencji emisja pozytonu (rozpad beta plus β^+). W wyniku oddziaływań pozytonów z elektronami w powietrzu ulegają one anihilacji. Oznacza to, że para pozyton-elektron zostaje zamieniona na wysokoenergetyczną parę fotonów gamma unoszącą energię 1022 keV. Schemat rozpadu izotopu sodu ^{22}Na został przedstawiony na rys. 2. Maksymalna energia pozytonów emitowanych z jądra w głównym kanale rozpadu wynosi 545 keV [MacKenzie 1983]. Dodatkowo izotop ten emitując pozyton przekształca się w

wzbudzone jądro neonu ^{22}Ne , które emituje jeszcze jeden kwant gamma o energii 1274,5 keV w procesie deekscytacji [National Nuclear Data Center 2015].



Rys. 2. Schemat rozpadu izotopu ^{22}Na
Źródło: opracowanie własne.

Pozyton emitowany w rozpadzie β^+ ma ciągłe widmo energii. Anihilacja pary pozyton-elektron zachodzi prawie wyłącznie z emisją dwóch kwantów gamma. Nieparzysta liczba fotonów pojawia się w sytuacji, gdy spiny anihilujących ze sobą cząstek są do siebie równoległe, ale anihilacje trój- i więcej kwantowe występują bardzo rzadko ze względu na niewielkie przekroje czynne względem anihilacji dwukwantowej. W ujęciu Diraca anihilacja dwukwantowa przyjmuje postać [Dirac 1928, Dirac 1930]:

$$\sigma_{2\gamma} = \pi \frac{\gamma_0^2}{\gamma^2 + 1} \left[\frac{1 + 4\gamma + \gamma^2}{\gamma^2 - 1} \ln(\gamma + \sqrt{\gamma^2 - 1}) - \frac{3 + \gamma}{\sqrt{\gamma^2 - 1}} \right], \quad (1)$$

gdzie γ jest czynnikiem Lorentza i wynosi: $\gamma = 1/\sqrt{1 - (v/c)^2}$, w którym v oznacza prędkość elektronu, a c jest prędkością światła.

Prawdopodobieństwo anihilacji z udziałem dwóch fotonów gamma nie zależy od prędkości pozytonu i jest proporcjonalne do gęstości elektronów n_e w miejscu anihilacji:

$$\lambda_{2\gamma} = \sigma_{2\gamma} v |\Psi(0)|^2 = \pi r_0^2 c n_e, \quad (2)$$

gdzie $\Psi(0)$ jest funkcją falową elektronu w miejscu pozytonu, a r_0 jest klasycznym promieniem elektronu.

W celu przeprowadzenia badania zbudowano ołowianą komorę (rys. 3). Wewnątrz komory umieszczono źródło radioaktywne ^{22}Na . Źródło to było zamknięte w folii kaptonowej w postaci kryształków $^{22}\text{NaCl}$ o aktywności 345 μCi , co jest równoważne aktywności 12,765 MBq w układzie SI. Oznacza to, że rozpad jąder promieniotwórczych, które są źródłem pozytonów, a w konsekwencji kwantów gamma, następuje z szybkością ponad 12 milionów wypromieniowań na sekundę.

Do komory wprowadzono wszystkie próbki, które zostały poddane ekspozycji na promieniowanie gamma od 10 do 90 minut.



Rys. 3. Rozsuwana komora ołowiana z umieszczonym wewnątrz emiterem promieniowania β^+
Źródło: opracowanie własne.

W drugiej części badania po ekspozycji próbek żywotnika zachodniego na promieniowanie gamma, inkubowano je przez 48 godzin w ciemności, co umożliwiło otwarcie pułapek energetycznych absorbujących promieniowanie powodujące zjawisko fluorescencji [Moran, Porath 1980]. Przygotowano po 3 gramy suchej masy roślinnej z każdej próbki, a następnie zalano roztworem acetonu, który jest dobrym rozpuszczalnikiem dla związków niepolarnych, jakimi są barwniki fotosyntetyczne, np. chlorofil [Bruinsma 1961]. Po dokładnym rozdrobnieniu roślin przesączono otrzymane ekstrakty przez sączek do zlewek i tak przygotowane próbki rozcieńczono 5-krotnie w celu eliminacji efektu wygaszania fluorescencji. Po rozcieńczeniu zmierzono odczyn próbek, który kształtował się w granicach 5,5–6 pH, a następnie wkładano je kolejno do spektrofluorymetru i dokonano pomiarów widma emisji w zakresie 500–750 nm fluorescencji chlorofilu przy fali wzbudzenia 420–430 nm. Pomiarów dokonano w tym

samym zakresie dla wszystkich otrzymanych próbek. Tę samą preparatykę zastosowano dla gałązek, które leżakowały 3 tygodnie. Analiza parametrów fluorescencji chlorofilu całkowitego pozwoliła na ocenę aktywności fotosyntetycznej, a tym samym określenie faktycznego stanu roślin.

Intensywność fluorescencji związana jest z ilością molekuł chlorofilu będących aktualnie w stanie wzbudzonym o tzw. zamkniętych pułapkach energetycznych, niezdolnych do przyjmowania elektronów. Im większa ich liczba, tym intensywniejsze zjawisko fluorescencji. Zjawisko to odzwierciedla aktywność aparatu fotosyntetycznego i jest miarą aktywności fotosyntetycznej liścia [Berg, Tymoczko, Stryer 2002]. Co więcej, analiza parametrów fluorescencji chlorofilu pozwala oceniać aktywność fotosyntetyczną, co jest szczególnie przydatne w przypadku wpływu na rośliny różnorodnych oddziaływań zewnętrznych.

Fotosynteza, jako biochemiczny proces wytwarzania związków organicznych z materii nieorganicznej zachodzący w komórkach zawierających chlorofil, należy do procesów najbardziej czułych na zmienność środowiska. W naszym przypadku czynnikiem zewnętrznym było promieniowanie jonizujące dla próbek badanych zaraz po ekspozycji, a także dodatkowo brak dostępu światła i wody w przypadku próbek, których badania wykonano po 3 tygodniach.

Niektórzy autorzy poruszają w swoich pracach tematykę mechanizmów tzw. szkód utajonych, które skutkują obniżeniem intensywności fotosyntezy, trudnych do wykrycia ze względu na brak widocznych gołym okiem objawów na roślinach [Oleksyn 1989]. Hamowanie procesu fotosyntezy powodowane uszkodzeniami związane jest z utrudnieniem procesu karboksylacji w roślinach [Karolewski 1989].

3. Dyskusja wyników

Po przeprowadzeniu badań wyznaczono względną zawartość chlorofilu całkowitego w próbkach poddanych długotrwałemu naświetlaniu wysokoenergetycznym promieniowaniem gamma. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że zawartość całkowitego chlorofilu w napromieniowanych próbkach roślin znacznie się zmniejszyła w stosunku do próbki referencyjnej. Obniżenie natężenia fluorescencji pochodzącej od chlorofilu można wiązać z destrukcyjnym działaniem

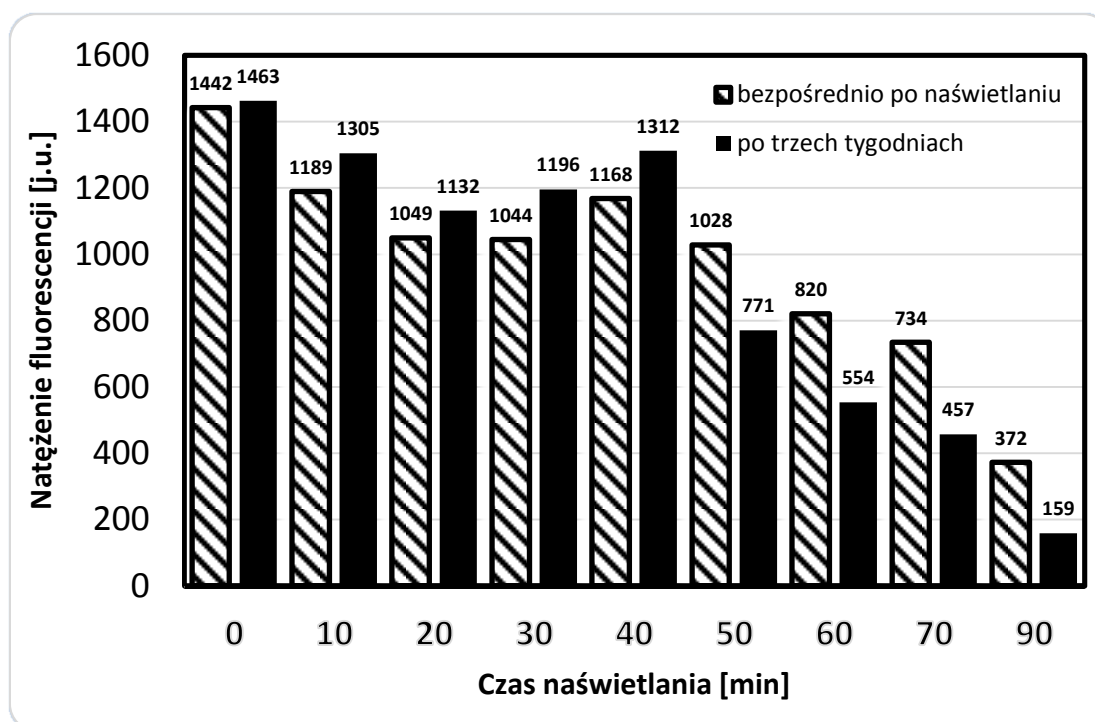
promieniowania gamma na pigmenty roślinne, co bezpośrednio wpłynęło na możliwości fotosyntetyczne badanych roślin. Wysoka energia promieniowania gamma zaburzyła proces fotosyntezy roślin w fotoukładach PSII i PSI, prowadząc do obniżonej zdolności absorbowania energii bezpośrednio odpowiedzialnych za efektywne przeprowadzanie fotosyntezy. Przeprowadzone badania znajdują potwierdzenie w innych pracach, m. in. [Ling i in. 2008, El-Mouhty i in. 2014], w których wskazuje się na silną korelację ujemną zawartości chlorofilu w innych roślinach poddanych działaniu przenikliwego promieniowania jonizującego.

Jak zaznaczono wcześniej, próbki były badane dwukrotnie — zaraz po ekspozycji na promieniowanie jonizujące oraz po 3 tygodniach. Wyniki maksymalnych wartości fluorescencji zarejestrowanych podczas pomiarów spektrofluorymetrem zestawiono w tabeli 1. Próbkę naświetlana przez czas 80 minut została usunięta ze względu na jej uszkodzenie podczas przygotowywania do pomiarów fluorymetrycznych. Graficznie wyniki pomiarów zostały przedstawione na rys. 4.

Tabela 1. Wyniki maksymalnych wartości fluorescencji w jednostkach umownych dla różnych czasów ekspozycji próbek

Czas ekspozycji w minutach		0	10	20	30	40	50	60	70	90
Względny poziom fluorescencji chlorofilu całkowitego	bezpośrednio po ekspozycji na promieniowanie jonizujące	1442	1189	1049	1044	1168	1028	820	734	372
	po 3 tygodniach przechowywania próbek	1463	1305	1132	1196	1312	771	554	457	159

Źródło: opracowania własne.



Rys. 4. Graficzna prezentacja wyników badań zależności natężenia fluorescencji od czasu naświetlania promieniowaniem gamma bezpośrednio po naświetlaniu i po 3 tygodniach leżakowania
Źródło: opracowanie własne.

Na rys. 4 zaobserwowano korelację ujemną związaną z czasem naświetlania próbek i poziomem emisji fluorescencji w szczególności w przypadku narażania roślin na promieniowanie trwające powyżej 40 minut. Niezależnie od tego, czy próbki zostały poddane badaniu bezpośrednio po ekspozycji czy po 3 tygodniach, można stwierdzić, że wysokoenergetyczne promieniowanie jonizujące wpływa destruktywnie na cząsteczki chlorofilu. W przedziale od 10 do 40 minut zauważono nieznaczne wahania emisji fluorescencji pochodzącej od wzbudzonego chlorofilu.

4. Wnioski

Zaprezentowane w niniejszej pracy badania miały na celu sprawdzenie, czy żywotnik zachodni może służyć jako biowskaźnik w przypadku skażenia środowiska radioizotopami emitującymi wysokoenergetyczne promieniowanie jonizujące.

W wyniku przeprowadzonych badań przedstawiono zależność pomiędzy czasem naświetlania próbek i intensywnością ich fluorescencji (rys. 4). Zauważono, że

promieniowanie gamma w niedużych dawkach może mieć neutralny wpływ na rośliny, a nawet poprawić ich wydajność fotosyntetyczną, na co wskazują w swoich badaniach także inni autorzy [Fan i in. 2014, Marcu i in. 2013]. Przypuszczalnie dochodzi wówczas do skracania odległości w łańcuchach tworzących cząsteczki chlorofilu na poziomie czwartorzędowym, w konsekwencji czego elektronom łatwiej jest pokonać przerwę energetyczną.

W przypadku próbek badanych po 3 tygodniach możemy również stwierdzić, że pomimo narażenia gałązek na stres w postaci braku światła czy wody, wykazują one dla czasów 10–40 minut zwiększoną ilość emitowanej fluorescencji, co może być związane ze zmianą ekspresji genu odpowiedzialnego za produkcję chlorofilu.

Przeprowadzone badania wskazują, że żywotnik zachodni może stanowić bio wskaźnik w przypadku zanieczyszczeń pochodzenia radioaktywnego, ponieważ pomimo braku widocznych gołym okiem zmian w wyglądzie rośliny promieniowanie jonizujące powoduje zmniejszenie się udziału nieuszkodzonych molekuł chlorofilu. Ponadto można wywnioskować, czy zanieczyszczenie miało charakter chwilowy czy długotrwały.

Obrazowanie fluorescencyjne chlorofilu pokazuje, że wydajność fotosyntezy w liściach jest bardzo zróżnicowana. Technika ta ma wiele zalet, dzięki którym może stanowić cenne narzędzie do wykrywania zmian strukturalnych, zanim pojawią się ich objawy widoczne dla ludzkiego oka. Chlorofile są związkami nietrwałymi. Charakterystyczną zieloną barwę zachowują tylko w żywych nieuszkodzonych tkankach.

Literatura

- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. [2002], *Biochemistry*, 5th edition, W H Freeman, New York.
- Běhounek F., Bohun A., Klumpar J. [1962], *Fizyka dla radiologów*, PWN, Warszawa.
- Bruinsma J. [1961], *A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll*, „*Biochemica et Biophysica Acta*”, Vol. 52, Iss. 3.
- Dirac P. A. M. [1928], *The quantum theory of the electron*, *Proceeding of the Royal Society*, Vol. 117.

- Dirac P. A. M. [1930], *A theory of electrons and protons*, Proceeding of the Royal Society A, Vol. 126.
- El-Mouhty N. R. A., Gad H. M. N., El-Naggar A. Y., Hassan R. F., Abdel Latif N. A. [2014], *Effect of gamma radiation on the structure and concentration analysis of chlorophyll and carotene of coriander seeds*, „International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology”, Vol. 3, Iss. 1.
- Fan J., Shi M., Jian-Zhong H., Xu J., Zhi-Dan W., De-Ping G. [2014], *Regulation of photosynthetic performance and antioxidant capacity by ^{60}Co γ -irradiation in *Zizania latifolia* plants*, „Journal of Environmental Radioactivity”, Vol. 129.
- Karolewski P. [1989], *Oddziaływanie zanieczyszczeń przemysłowych na procesy fizjologiczne i metabolizm roślin* [w:] *Życie drzew w skażonym środowisku*, red. S. Białobok, Instytut Dendrologii PAN, PWN, Warszawa-Poznań.
- Ling A. P. K., Chia J.Y., Hussein S., Harun A.R. [2008], *Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation*, „World Applied Sciences Journal”, Vol. 5, Iss. 1.
- MacKenzie I. K. [1983], *Experimental Methods of Annihilation Time and Energy Spectroscopy*, Positron Solid-State Physics, Amsterdam, New York, Oxford.
- Marcu D., Cristea V., Daraban L. [2013], *Dose-dependent effect of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) seedlings*, „International Journal of Radiation Biology”, Vol. 89(3).
- Moran R., Porath D. [1980], *Chlorophyll determination in intact tissues using *N,N*-Dimethylformamide* „Plant Physiology”, Vol. 65, Iss. 3.
- National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory [2015]
<http://www.nndc.bnl.gov/> (data dostępu: 11.11.2015).
- Oleksyn J. [1989], *Wymiana gazowa i gospodarka wodna* [w:] *Klony. Nasze drzewa leśne*, Monografie Popularnonaukowe, red. W. Bugała, Instytut Dendrologii PAN, Bogucki Wydawnictwo Naukowe S. C., Poznań-Kórnik.
- Siemiński M. [1994], *Fizyka zagrożeń środowiska*, PWN, Warszawa.