

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ И ДУБА ИЗ 30-КИЛОМЕТРОВОЙ ЗОНЫ ЧАЭСЕ. И. Левчик¹, Е. В. Сваричевская, Г. О. Бекирова, Е. Г. Гуле²,
А. А. Одинцов, Н. А. Шовкун¹ Центр аэрокосмических исследований Земли ИГН НАН Украины, Киев² Институт полупроводников НАН Украины, Киев

Представлены результаты многолетних исследований спектров индуцированной лазером флуоресценции ($\lambda_{\text{возб.}} = 337,1$ нм; $\Delta\lambda_{\text{фл.}} = 400 - 800$ нм) листопадных растений (дуб, береза), произрастающих в условиях (перманентного) радиоактивного загрязнения разной степени в зоне отчуждения ЧАЭС.

Действие радиации на живые организмы изучается различными методами и на различных уровнях: биохимическом, физиологическом, анатомо-морфологическом и т.д. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. Основным недостатком является их излишняя направленность, в результате чего полученная информация, как правило, бывает односторонней. Стремясь уйти от этой односторонности, а также от артефактов, связанных с разрушением тканей, были направлены усилия на поиск такого метода, который использует анализ тканей *in vivo*, не повреждая их. Был выбран метод индуцированной лазером флуоресценции, который хорошо зарекомендовал себя не только в биохимических, физических, но и в геоэкологических, сельскохозяйственных исследованиях. Информация, полученная этим методом, является отражением мгновенного состояния клеточных и тканевых структур растения, обусловленного взаимодействием внутренних (онтогенетических) и внешних (экологических) факторов.

Факт старения или процессов, напоминающих старение, при воздействии радиации хорошо известен [1]. Ранее нами было обнаружено, что данный метод позволяет не только различать старые и молодые листья на одном растении, но и обладает высокой физиологической чувствительностью [2].

В качестве объектов исследования были взяты листопадные древесные растения: береза бородавчатая и дуб красный, широко распространенные в зоне исследования и характеризующиеся высокой экологической пластичностью. Отбор растительного материала осуществляли на трех полигонах: участок «Факел» (посадка 1988 г. на месте бывшего «Рыжего леса»), Копачи и Черевач. Контролем служили растения из Киевской и Полтавской областей.

Исследования спектров флуоресценции (СФ) *in vivo* проводились на лабораторной лазерной установке, созданной на базе комплекса КСВУ-23 в Институте полупроводников НАН Украины, которая позволяет получать спектры индуцированной лазером ($\lambda_{\text{возб.}} = 337,1$ нм) флуоресценции в диапазоне 400 - 800 нм.

Исследования проводили в разные сроки вегетации в связи с возможным изменением чувствительности растений к воздействию радиации на отдельных фазах развития. Растительный материал отбирали с нижних, средних и верхних ярусов кроны. Такой отбор связан с тем, что листья, расположенные в разных частях кроны, находятся под неодинаковым давлением действующих внешних и внутренних факторов (закон Зеленского) и различаются структурой, активностью физиологических процессов, способностью реагировать на экологические факторы, а также оптическими свойствами.

Сначала отобранные образцы подвергались флуоресцентным исследованиям, а затем направлялись на гамма-спектрометрический и радиохимический анализы.

Образцы листьев высушивали до воздушносухого состояния и отбирали навески для гамма-спектрометрии. После измерений из этого же образца бралась навеска для выделения стронция.

Определение содержания гамма-излучающих радионуклидов проводили с помощью спектрометрической линейки фирмы ORTEC на базе горизонтальных коаксиальных HPGe-детекторов GMX-30190 и GEM-40195. Обработку гамма-спектров проводили, используя пакет программ MAESTRO for Windows. Нижний пороговый уровень детектирования ^{137}Cs составлял 0.1 - 2 Бк в зависимости от типа детектора и геометрии измерений.

Определение удельной активности ^{90}Sr в исследуемых образцах проводили по радиохимической методике [3].

Химический выход ^{90}Sr определялся весовым методом по выходу стабильного стронция. Измерения активности ^{90}Sr проводились на радиометрах ROBOTRON 20046. Нижний пороговый уровень детектирования ^{90}Sr составлял от 0.1 Бк/образец.

Оценку доз внешнего гамма-облучения листьев проводили на основании фактических результатов измерения мощности экспозиционной дозы гамма-излучения на различной высоте над поверхностью земли.

Дозы внутреннего облучения оценивали на основании результатов измерения удельной активности изотопов ^{137}Cs и ^{90}Sr в листе с использованием традиционных подходов и современных разработок этой проблемы [4].

Для анализа СФ использовали всю кривую в диапазоне 400 - 800 нм и отдельные флуоресцентные параметры (ФП), под которыми подразумевались величины интенсивностей флуоресценции (в относительных единицах) на отдельных длинах волн I_{λ_i} и соотношения этих величин $I_{\lambda_i}/I_{\lambda_j}$. Все результаты обработаны статистически с использованием одно-, двухфакторного дисперсионного анализа, а также программы Statistica, версия 5.0.

СФ характеризовались наличием максимумов у 440, 525, 685 и 735 нм. Согласно устоявшемуся мнению, максимумы СФ в красной области являются отражением деятельности нативных пигмент-белковых комплексов: светособирающего хлорофилл-белкового комплекса (СХБК), фотосистем I и II (ФС I, ФС II). Ближний красный максимум у 680 - 685 нм является суперпозицией полос флуоресценции СХБК и собственно актенны ФСII, дальний - у 735 нм актенны ФСI [5 - 8]. Сдвиги максимумов, появление плеч при воздействии факторов (дефицит влаги, условия минерального питания и т.д.) свидетельствуют о сложной структуре красной области [2, 6, 9].

Принадлежность максимумов синей области до сего времени дискутируется. Имеются сведения, что флуоресценция у 460 и 440 нм обусловлена, соответственно, свободными и связанными формами восстановленных пиридиннуклеотидов: никотинадениннуклеотида (НАД-Н) и никотинамиддинуклеотидфосфата (НАДФ-Н). Связывание соответствующих форм НАД-Н и НАДФ-Н с соответствующими дегидрогеназами приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции. При этом местоположение максимума сдвигается в коротковолновую сторону. Максимум у 525 нм (510 - 530 нм) связывают со свободными формами флавиновых коферментов (флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид), рибофлавином и продуктами его деградации. Этот максимум иногда называют «стрессовым», поскольку появление и возрастание его интенсивности наблюдали в неблагоприятных условиях (гербициды, сульфатное загрязнение) [7, 10]. Имеются сведения, что вклад во флуоресценцию синей области вносят и другие компоненты: полисахариды, лигнин клеточной стенки, вещества фенольной природы и др., количество и состояние которых существенно влияют на интенсивность флуоресценции синей зоны [8], а также сведения о локализации веществ, ответственных за синюю флуоресценцию, в эпидермисе, клеточных стенках вакуолей [2, 8].

Результаты исследований СФ листовых пород показали, что местоположения максимумов СФ, соотношения их интенсивностей (структура СФ) могут существенно

изменяться в зависимости от времени исследований (фазы развития) и условий произрастания.

Как показали наши исследования растений из зоны отчуждения в 1988 г. [2], на изменения СФ листьев березы преобладающее влияние оказывают процессы онтогенеза (степень влияния в зависимости от длины волны - 70 - 90 %) по сравнению с условиями произрастания (4 - 15 %), но в отдельные моменты времени (весна - лето) влияние исследуемого фактора может быть весьма значительным. Так, в момент распускания листьев особенно велико влияние на зелено-оранжевую зону (84 - 98 % в зависимости от длины волны флуоресценции). Визуально на СФ это регистрировалось появлением доминирующего максимума - 540 - 580 нм. Необходимо отметить, что в мае 1986 г. это наблюдалось и у некоторых других растений, произрастающих в Киеве, например у одуванчика и тополя.

Исследования, проведенные спустя 12 - 13 лет после аварии на ЧАЭС, выявили у березы и дуба из зоны отчуждения наличие четких изменений СФ по сравнению с контрольными растениями. У березы из «Рыжего леса» и с. Копачи снова регистрировался максимум у 540 - 560 нм. У дуба отмечен сдвиг основного максимума синей зоны в более коротковолновую сторону (с 440 - 460 до 420 - 440 нм). Наиболее четко эти изменения выражены у листьев со средней и верхушечной частями кроны (рис. 1).

Для обоих видов характерным оказалось значительно более низкое соотношение интенсивности флуоресценции в красной и синей зонах по сравнению с контролем, т.е. наблюдалась своеобразная оптическая ксероморфизация листьев (явление, сопровождающее старение) [2].

Специфика видовой реакции на условия жизни выявлена и на уровне величин удельной активности ^{137}Cs и ^{90}Sr , а также рассчитанных по этим данным дозовых нагрузок. Так, удельная активность изотопов в листьях дуба выше в 2 - 5 для ^{90}Sr и в 2 - 25 раз - для ^{137}Cs (у березы - первые сотни кБк/кг, у дуба - тысячи). Для березы характерно повышение удельной активности ^{137}Cs с высотой расположения в пределах кроны, особенно четко выраженное у березы с участка «Факел». Для «поведения» ^{90}Sr характерен противоположный характер. В то же время для дуба такая однозначная зависимость не выявлена.

Комплексный анализ флуоресцентных и радиологических показателей, введение их в корреляционную матрицу в качестве признаков позволили установить, что флуоресцентные и радиологические признаки листьев дуба характеризовались существенными и разнообразными корреляционными связями. Так, для ^{137}Cs выявлена положительная корреляция с зеленой зоной 520 - 550 нм ($0.49 \geq r \geq 0.54$, где r - коэффициент корреляции) и с ФП 685/730 ($r = 0.69$), отражающим степень сформированности фотосинтетического аппарата [5]. Корреляционные связи ^{90}Sr и ФП дуба более существенны и разнообразны, что свидетельствует о более сильном влиянии ^{90}Sr . Например, в диапазоне 460 - 650 нм r варьирует в пределах 0.63 - 0.80, для ФП 460/400, 460/520 и 685/730 коэффициенты корреляции составляют 0.74, 0.75 и 0.83 соответственно. Береза характеризуется более низкими значениями r . Выявлено существование связи обоих изотопов с синей зоной ($r = 0.43$ для ^{90}Sr и $r = 0.53$ для ^{137}Cs) и ФП 460/400 ($r = 0.7$).

Таким образом, в изменения ФП листьев свой вклад вносят все источники излучения. Однако наибольшее влияние оказывает изотоп ^{90}Sr . Обработка результатов исследования методом факторного анализа (Statistica, версия 5.0) позволила четко разделить растения в зависимости от условий произрастания (рис. 2 и 3).

В соответствии с первым фактором (F_1) листья растений березы и дуба, которые произрастают в условиях бывшего «Рыжего леса», четко отделяются от остальных (села Черевач и Копачи). При этом листья березы характеризуются отрицательными значениями F_1 , тогда как F_1 , рассчитанный для листьев дуба, имеет знак плюс. Факторный анализ, проведенный с последовательным исключением отдельных признаков, показал, что анализ

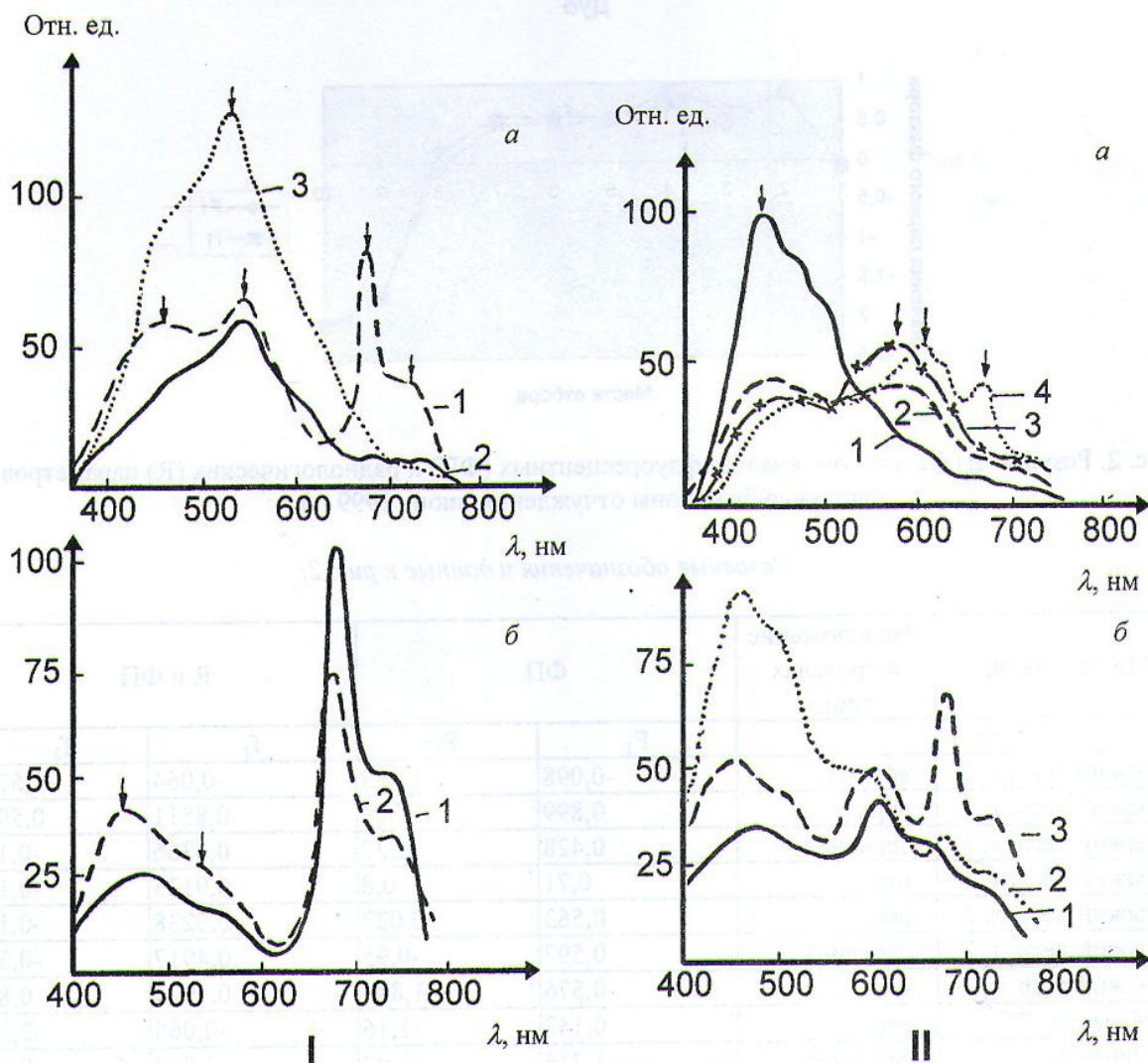


Рис. 1. Спектры флуоресценции листьев березы (I) и дуба (II), произрастающих на участке "Факел" (а) и в Полтавской области (б), 1998 г.:

для дуба - а: 1 - СФ молодого листа; 2, 3 - варианты СФ июльских листьев; 4 - СФ коричневого октябрьского листа;

б: варианты СФ июльских листьев;

для березы - а: 1, 2 - варианты СФ июльских листьев; 3 - СФ желтых октябрьских листьев;

б: варианты СФ июльских листьев.

только флуоресцентных параметров листьев дает практически тот же результат, что и расчет, проведенный с учетом дозовых нагрузок или удельной активности.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлена принципиальная возможность использования спектральных параметров индуцируемой лазером флуоресценции в качестве чувствительного индикатора для определения участков с повышенными уровнями радиоактивного загрязнения.

Дуб

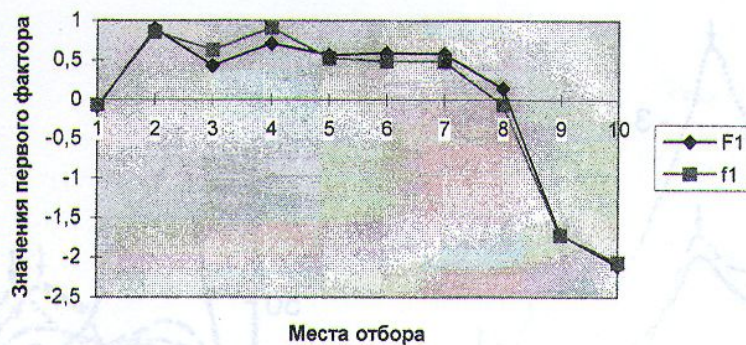


Рис. 2. Результаты факторного анализа флуоресцентных (ФП) и радиологических (R) параметров листьев дуба из зоны отчуждения (июнь 1999 г.).

Условные обозначения и данные к рис. 2:

Место отбора	Расположение в пределах кроны	ФП		R и ФП	
		F ₁	F ₂	f ₁	f ₂
1. «Рыжий лес», т. 3	верх	-0,098	1,183	-0,064	1,576
2. «Рыжий лес», т. 1	верх	0,899	0,309	0,8511	0,506
3. «Рыжий лес», т. 1	середина	0,428	-0,22	0,6366	-0,14
4. «Рыжий лес», т. 1	низ	0,71	-0,8	0,9125	-0,15
5. «Рыжий лес», т. 2	верх	0,563	0,022	0,5238	-0,11
6. «Рыжий лес», т. 2	середина	0,597	-0,95	0,4917	-0,32
7. «Рыжий лес», т. 2	низ	0,576	1,884	0,4924	0,85
8. с. Черевач	верх	0,147	-1,16	-0,066	-2,36
9. с. Черевач	середина	-1,714	-1,07	-1,719	-0,48
10. с. Черевач	низ	-2,108	0,801	-2,06	0,627

Береза

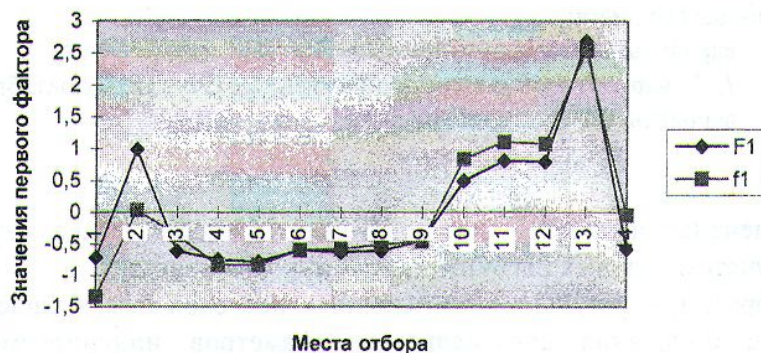


Рис. 3. Результаты факторного анализа флуоресцентных (ФП) и радиологических (R) параметров листьев березы из зоны отчуждения (июнь 1999 г.).

Условные обозначения и данные к рис. 3:

Место отбора	Расположение в пределах кроны	ФП		R и ФП	
		F ₁	F ₂	f ₁	f ₂
1. «Рыжий лес», т. 15	верх, молодые	-0,719	1,458	-1,335	1,818
2. «Рыжий лес», т. 15	верх, одревеснев- шие побеги	0,988	-1,038	0,031	2,599
3. Дорога на Чистогаловку		-0,617	0,643	-0,367	-0,638
4. «Рыжий лес», т. 1	верх	-0,752	-0,513	-0,828	-0,238
5. «Рыжий лес», т. 1	середина	-0,781	0,263	-0,829	-0,246
6. «Рыжий лес», т. 1	низ	-0,597	0,818	-0,604	-0,265
7. «Рыжий лес», т. 2	верх	-0,638	-0,428	-0,59	-0,52
8. «Рыжий лес», т. 2	середина	-0,612	-0,186	-0,524	-0,587
9. «Рыжий лес», т. 2	низ	-0,461	-0,754	-0,478	-0,273
10. с. Черевач	верх	0,498	-0,871	0,847	-0,591
11. с. Черевач	середина	0,809	-0,534	1,115	-0,478
12. с. Черевач	низ	0,785	-1,673	1,081	-0,511
13. с. Копачи, конец 1-го ряда		2,689	1,795	2,537	0,92
14. с. Копачи, 2-й ряд, дерево 4		-0,593	1,02	-0,059	-0,991

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гродзинский В.М. Биологическое действие ионизирующей радиации // Биофизика / Под ред. П.Г. Костюк. – Киев: Вища шк., 1988. – С. 387 - 433.
2. Мовчан Я.И., Каневская В.А., Семичаевский В.Д. и др. Фитоиндикация в дистанционных исследованиях. – Киев: Наук. думка, 1993.
3. Агеев В.А., Ключников А.А., Одицов А.А. и др. Способ определения содержания плутония, продуктов деления урана и трансурановых элементов в окружающей среде: А. С. № 1701047, 1991.
4. Бочкарев В.В., Комаров Н.А., Радзиевский Г.Б., Тимофеев Л.В. Распределение поглощенной энергии от источников бета-излучения в тканезквивалентных средах // Медицинская радиология. 1974. - № 12. - С. 56 - 61.
5. Lichtenthaler H.K., Rinderle U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants // Crit. Rev. Anal. Chem. - 1988. - Vol. 19, Supl. 1. - P. 529 - 585.
6. Гачковский В.Ф. Спектры люминесценции хлорофилла в листьях различных родов растений // Докл. АН СССР. – 1987. – Т. 292, № 1. - С. 236 - 249.
7. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. – М.: Мир, 1965. – С. 219 - 262.
8. Stober F., Long M., Lichtenthaler H.K. Blue, green and red fluorescence Emission Signatures of Green, Etiolated, and White Leaves // Remote Sens. Environ. – 1994. – Vol. 47. – P. 65 - 71.
9. Chappelle E.W., Williams D.L. Laser-induced fluorescence (LIF) from Plant Foliage // IEEE Transaction Geoscience and Remote sensing. - 1987 – Vol. GE - 25, No. 6. – P. 726 - 736.
10. Карнаухов В.Н., Керженцев А.Г., Яшин В.А. Люминесцентный метод биоиндикации состояния экосистем. – Пушкино, 1982. – 24 с. – (Препр. / ОНТИ НЦ БН СССР).

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕКТРІВ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ЛИСТЯ БЕРЕЗИ
ТА ДУБА З 30-КІЛОМЕТРОВОЇ ЗОНИ ЧАЕС**

**О. І. Левчик, О. В. Сваричевська, Г. О. Бекірова, Є. Г. Гуле,
О. О. Одинцов, М. О. Шовкун**

Наведено результати багаторічних досліджень спектрів індукованої лазером флуоресценції ($\lambda_{\text{возб.}} = 337,1 \text{ нм}$; $\partial\lambda_{\text{фл.}} = 400 - 800 \text{ нм}$) листопадних рослин (дуб, береза), що зростають в умовах (безперервного) радіоактивного забруднення різного ступеню в зоні відчуження ЧАЕС.

**THE RESULTS OF FLUORESCENCE SPECTRUMS OF OAK AND BIRCH LEAVES
INVESTIGATION FROM THE 30-KILOMETRE INFLUENCED ZONE
OF CHERNOBYL NPP**

**E. I. Levchik, E. V. Svarichevskaya, G. O. Bekirova, E. G. Gule,
A. A. Odintsov, N. A. Shovkun**

The results of a long-term research of lazer induced fluorecence of foliage trees' leaves (oak, birch) that grow in different conditions of radioactive pollution (30 - kilometre zone of Chernobyl NPP) are presented.