

## ИНДУЦИРОВАННАЯ ЛАЗЕРОМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХВОИ СОСЕН, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ РАДИОНУКЛИДАМИ ЧЕРНОБЫЛЬСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е. И. Левчик<sup>1</sup>, Е. В. Сваричевская<sup>2</sup>, Л. В. Скрипка<sup>3</sup>, Н. Д. Кучма<sup>4</sup>, В. К. Заика<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Центр аэрокосмических исследований ИГН НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт ядерных исследований НАН Украины, Киев

<sup>3</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев

<sup>4</sup> Государственное предприятие "Экоцентр", Чернобыль

<sup>5</sup> Украинский государственный лесотехнический университет, Львов

Представлены результаты многолетних исследований спектров индуцированной лазером флуоресценции (СФ) хвои сосен, произрастающих в условиях загрязнения радионуклидами чернобыльского происхождения. Проведен комплексный анализ флуоресцентных, биометрических, радиологических и биохимических параметров хвои. Обнаружены различия во влиянии инкорпорированных радионуклидов <sup>137</sup>Cs и <sup>90</sup>Sr на отдельные зоны СФ хвои. Показано, что анализ СФ разновозрастной хвои может быть использован в качестве тест-метода для обнаружения загрязнения радионуклидами <sup>137</sup>Cs и <sup>90</sup>Sr.

Основной задачей радиобиологии является изыскание способов защиты человека, животного и растительного мира от поражающего влияния излучений [1]. Растения, произрастающие в 30-километровой зоне Чернобыльской АЭС, представляют собой уникальный объект для исследования длительного влияния радиоактивного загрязнения на биоту, поскольку такой широкий спектр доз облучения, в первую очередь внутреннего, за счет комплекса α-, β- и γ-излучения в искусственных условиях создать практически невозможно.

В многоклеточном организме облучение инициирует ряд процессов, которые в совокупности составляют радиационный синдром [1]. Это создает значительные трудности в диагностике радиационного поражения и требует разработки особых методических подходов, охватывающих радиационный синдром в целом. Такому требованию отвечает метод индуцированной лазером флуоресценции, который позволяет *in vivo*, не повреждая и не разрушая тканей и органов, оценивать физиологическое состояние исследуемых объектов [2 - 10].

Целью данных исследований является разработка экспресс-метода, позволяющего оценить физиологическое состояние растений, подвергшихся воздействию инкорпорированных радионуклидов в природных условиях зоны отчуждения, а также приблизиться к пониманию физиологических механизмов их действия на живые организмы.

Исследование спектров индуцированной лазером флуоресценции (СФ) проводилось на лабораторной лазерной флуоресцентной установке, созданной на базе комплекса КСВУ-23, которая позволяет получать СФ в диапазоне 400÷800 нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 337,1$  нм, азотный лазер ЛГИ-21).

В качестве объекта исследования была выбрана сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), повсеместно распространенная в зоне исследований, обладающая высокой экологической пластичностью и исключительно высокой радиочувствительностью. Необходимо отметить, что сосна как вечнозеленое растение характеризуется еще одной интересной особенностью: на ее ветках одновременно присутствует хвоя разных лет формирования, которая несет в себе скрытую интегрированную физиологическую информацию о внутреннем состоянии и об условиях окружающей среды как сиюминутную, так и накопленную в течение существования хвои и всего дерева. Получение и анализ этой скрытой информации представляется весьма перспективным в плане наших исследований.

Отбор растительного материала проводили на территории зоны отчуждения: в 1987 - 1989 гг. близ населенных пунктов Черевач, Залесье, Чернобыль (минимальный уровень

радиоактивного загрязнения по  $\gamma$ -фону и поглощенным дозам), сел Копачи (средний уровень), Припять, Шепеличи, Ново-Шепеличи (максимальный уровень) [2]; в 1996 - 1999 гг. – на участке “Факел” (посадка 1987 г. на месте бывшего “Рыжего леса”) и близ сел Копачи, Чистоголовка, Черевач. Плотность загрязнения территории варьирует в широких пределах. Так, в 1998 г. в районе бывшего “Рыжего леса” плотность загрязнения составляла по  $^{137}\text{Cs}$  до 67101 Ки/км<sup>2</sup>, по  $^{90}\text{Sr}$  до 11003 Ки/км<sup>2</sup>, а  $\gamma$ -фон колебался в пределах 2 - 11 мР/ч. В с. Копачи эти значения составляли соответственно по  $^{137}\text{Cs}$  48,79 Ки/км<sup>2</sup>, по  $^{90}\text{Sr}$  28,98 Ки/км<sup>2</sup>, а  $\gamma$ -фон - 0,3 мР/ч. Для с. Чистоголовка плотность загрязнения составляла по  $^{137}\text{Cs}$  386,8 Ки/км<sup>2</sup> (по  $^{90}\text{Sr}$  не исследовалась), а  $\gamma$ -фон - 1,5 – 2 мР/ч. В качестве контрольной группы использовали сосны, произрастающие в разных местах Киевской и Полтавской областей.

Сначала отобранные образцы подвергались флуоресцентным исследованиям, а потом направлялись на  $\gamma$ -спектрометрический и радиохимический анализы.

Образцы хвои высушивали до воздушно-сухого состояния и отбирали навески для  $\gamma$ -спектрометрии. После измерений из этого же образца бралась навеска для выделения стронция.

Определение содержания  $\gamma$ -излучающих радионуклидов проводили с помощью спектрометрической линейки фирмы ORTEC на базе горизонтальных коаксиальных HPGe-детекторов GMX-30190 и GEM-40195. Обработку  $\gamma$ -спектров проводили используя пакет программ MAESTRO for Windows. Нижний пороговый уровень детектирования  $^{137}\text{Cs}$  составлял 0,1 - 2 Бк в зависимости от типа детектора и геометрии измерений.

Определение удельной активности  $^{90}\text{Sr}$  в исследуемых образцах проводили по радиохимической методике [11].

Химический выход  $^{90}\text{Sr}$  определялся весовым методом по выходу стабильного стронция. Измерения активности  $^{90}\text{Sr}$  проводились на радиометрах ROBOTRON 20046. Нижний пороговый уровень детектирования  $^{90}\text{Sr}$  составлял от 0,1 Бк/образец.

Параллельно проведено изучение накопления в хвое пластидных пигментов (хлорофиллов а и в, суммы каротиноидов), фотохимической активности хлоропластов, биоэлектрической активности, а также наиболее общих параметров, которые характеризуют ростовые процессы (высоту деревьев, длину хвои, побегов, диаметр корневой шейки).

Концентрацию пигментов определяли в ацетоновых экстрактах на спектрофотометре СФ-16 по общепринятой методике [12]. Биоэлектрическую активность модельных деревьев (участок “Факел”) исследовали по методике [13]. Для измерения биопотенциалов использовали высокоомный биопотенциометр и неполяризованные хлорсеребряные электроды. Потенциальную интенсивность фотосинтеза хвои определяли радиометрическим методом [14]. Для этого с каждого варианта отбирали по несколько хвоинок и помещали их в ассимиляционную камеру. Образцы экспонировали в течение 10 мин, после чего фиксировали в 96 %-ном этаноле, высушивали и растирали в порошок, заливали сцинтиллирующей жидкостью и определяли их радиоактивность на жидкостном сцинтилляторном счетчике “Rackbeta”. Расчет содержания пигментов и интенсивности фотосинтеза производили на абсолютно сухую массу (мг/г и мг  $\text{CO}_2$ /г соответственно).

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  $I_{\lambda_i}$  и соотношения этих величин  $I_{\lambda_i}/I_{\lambda_j}$ .

Все результаты обработаны статистически с использованием одно- и двухфакторного дисперсионного анализа, а также программы Statistica, версия 5.0.

СФ растений *in vivo* характеризуются наличием максимумов у 440, 525, 685 и 735 нм [2 - 5, 7 - 10]. В наших исследованиях в СФ сосны у 525 нм (510 – 530 нм) регистрировались плечи различной степени выраженности. 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 [7, 8, 9]. Сдвиги максимумов, появление плеч при воздействии факторов (дефицит влаги, условия минерального питания и т.д.) свидетельствуют о сложной структуре красной области [2, 4, 7, 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 (NAD-H) и никотинамиддинуклеотидфосфата (NADP-H). Связывание соответствующих форм NAD-H и NADP-H 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, флавинаденидинуклеотид), рибофлавином и продуктами его деградации. Проявление и возрастание этого максимума при неблагоприятных условиях (гербициды, сульфатное загрязнение, заболевания) зарегистрировано у ряда биологических объектов (водоросли, лейкоциты, а также некоторые высшие растения) [3, 5, 6]. В то же время вклад во флуоресценцию синей области листьев высших растений вносят и другие компоненты (полисахариды, лигнин клеточной стенки, вещества фенольной природы и др.), количество и состояние которых существенно влияют на интенсивность флуоресценции синей зоны [6, 8, 9]. Имеются сведения о локализации веществ, обуславливающих синюю флуоресценцию, в эпидермисе, клеточных стенках вакуолей [2, 9, 15].

Исследования СФ хвои сосны из 30-километровой зоны ЧАЭС, проведенные в 1987 - 1988 гг. в весенне-летний период, показали, что возрастные изменения СФ (исследовали хвою прошлого года формирования, так как хвоя последнего прироста была слишком мала) являются доминирующими по сравнению с влиянием условий радиоактивного загрязнения. Степени влияния данных факторов на отдельные зоны СФ составляют 85 - 90 и 2 - 6 % соответственно при уровне достоверности  $F \geq 05$  (рис. 1). Однако в пределах одного интервала времени влияние условий радиоактивного загрязнения на отдельные полосы СФ может достигать ощутимых значений и со временем нарастает (до 90 % при  $F \geq 05$ ). Наибольший практический интерес представляют диапазоны 530 - 620 и 660 - 740 нм. Интересно отметить, что максимальное влияние на эти диапазоны выявляется как у радиочувствительной сосны, так и радиоустойчивой березы [2, 12]. Анализируя изменения

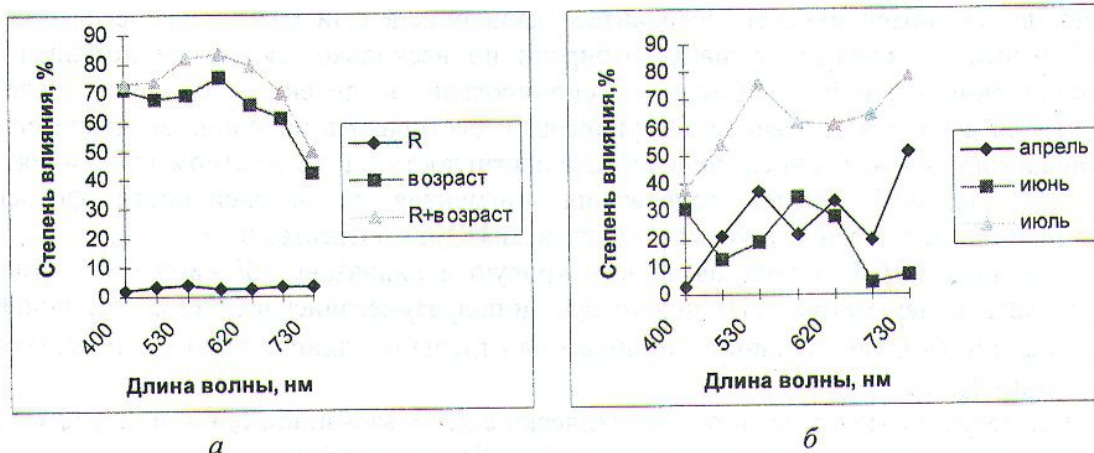


Рис. 1. Влияние условий радиоактивного загрязнения на отдельные полосы СФ хвои сосны по данным однофакторного (а) и двухфакторного (б) дисперсионного анализа, 1988 г. R – радиоактивное загрязнение (уровни  $\gamma$ -фона и поглощенных доз: максимальный – г. Припять, села Шепеличи и Ново-Шепеличи; средний – с. Копачи; минимальный – села Черевач и Залесье).

СФ хвой сосны и листьев березы с учетом фенофаз, нетрудно заметить, что у обоих видов максимальное влияние условий радиоактивного загрязнения, регистрируемое по изменениям СФ, проявляется в период распускания листьев и побегов: у березы - в апреле, степень влияния до 90 %, у сосны - в июне, степень влияния также до 90 % при  $F \geq 0.5$ . Данное обстоятельство позволяет предположить существование "критических" периодов, характеризующихся максимальной интенсивностью физиологических процессов – распускание листьев, побегов, на протяжении которых влияние исследуемого фактора максимально. Возможно, характер изменений физиологического состояния растений в условиях радиоактивного загрязнения базируется на едином механизме у чувствительных и устойчивых видов. Но это требует дополнительных исследований.

Исследования, проведенные спустя 11 - 12 лет после аварии на ЧАЭС, выявили, что спектр морфологических нарушений сосны в 1997 г. напоминал таковой в 1987 г. Для деревьев с участка "Факел" и с. Копачи характерны укороченные побеги, карликовость хвой (43 и 4 % соответственно), гигантизм хвой, различные нарушения ориентации, "мятая хвоя" (5 и 36 % соответственно), множественность закладки почек, верхушек, "метлоподобность" побегов, некрозы (36 и 12 %), двойной прирост в течение одного года (6 и 8 %). На участке "Факел" морфозы встречались у 84 % растений, в с. Копачи - у 34 %, тогда как в контрольных посадках - у 5 - 6 %.

Анализ СФ разновозрастной хвой сосны из различных участков зоны отчуждения в сравнении с контрольными растениями показал, что возрастная динамика СФ хвой у контрольных сосен и сосен из зоны принципиально одинакова и заключается в перераспределении интенсивности по СФ в пользу синей области. Однако выявлено два основных способа возрастных изменений СФ: один из них принадлежит контрольным растениям, другой, имеющий несколько модификаций, - растениям из зоны отчуждения.

Так, у контрольных растений перераспределение интенсивности по СФ в пользу синей области происходит за счет значительного - более чем двукратного - возрастания интенсивности флуоресценции в диапазоне 400 - 620 нм и некоторого ее снижения в красной. Одновременно наблюдается сдвиг основного максимума синей зоны с 430 нм у молодой хвой до 440 нм у хвой третьего года. В то же время у сосен с участка "Факел", с. Копачи и других населенных пунктов зоны отчуждения синяя зона СФ практически не изменялась с возрастом, тогда как интенсивность флуоресценции в красной снижалась на 30 - 50 % с каждой возрастной ступенькой (рис. 2). Местоположение основного синего максимума, исходно сдвинутого у молодой хвой в сторону более коротких длин волн (420 нм), оставалось стабильным. В ряде случаев наблюдалось заполнение синефиолетового диапазона. Поскольку флуоресценция в этой зоне обусловлена компонентами эпидермиса и кутикулы (феруловой кислотой, лигнином и др.) можно предположить изменения в метаболизме данных веществ. Следует отметить, что аналогичный сдвиг синего максимума в коротковолновую сторону выявлен нами в подобных обстоятельствах у листьев дуба, который накапливает значительные количества дубильных веществ [10]. Кроме того, необходимо отметить существенное возрастание изменчивости СФ растений в условиях радиационной нагрузки, о чем свидетельствует увеличение в 1,5 - 2 раза коэффициентов вариации интенсивностей флуоресценции на отдельных длинах волн и других ФП. Особенно ярко это выявляется у молодой хвой.

Таким образом, анализ возрастной динамики СФ хвой сосны вполне пригоден для оценки состояния растений в условиях почвенного загрязнения радионуклидами. Поскольку в условиях 30-километровой зоны растения сосны в силу ряда различных причин (загрязнение радионуклидами, поражение корневой губкой и пр.) часто имеют хвою только двух лет, то в методических целях достаточно провести анализ возрастной динамики хвой I и II годов формирования.

Специфика возрастной реакции хвой на условия жизни в зоне отчуждения проявляется и на уровне величин удельной активности  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$ , а также рассчитанных по

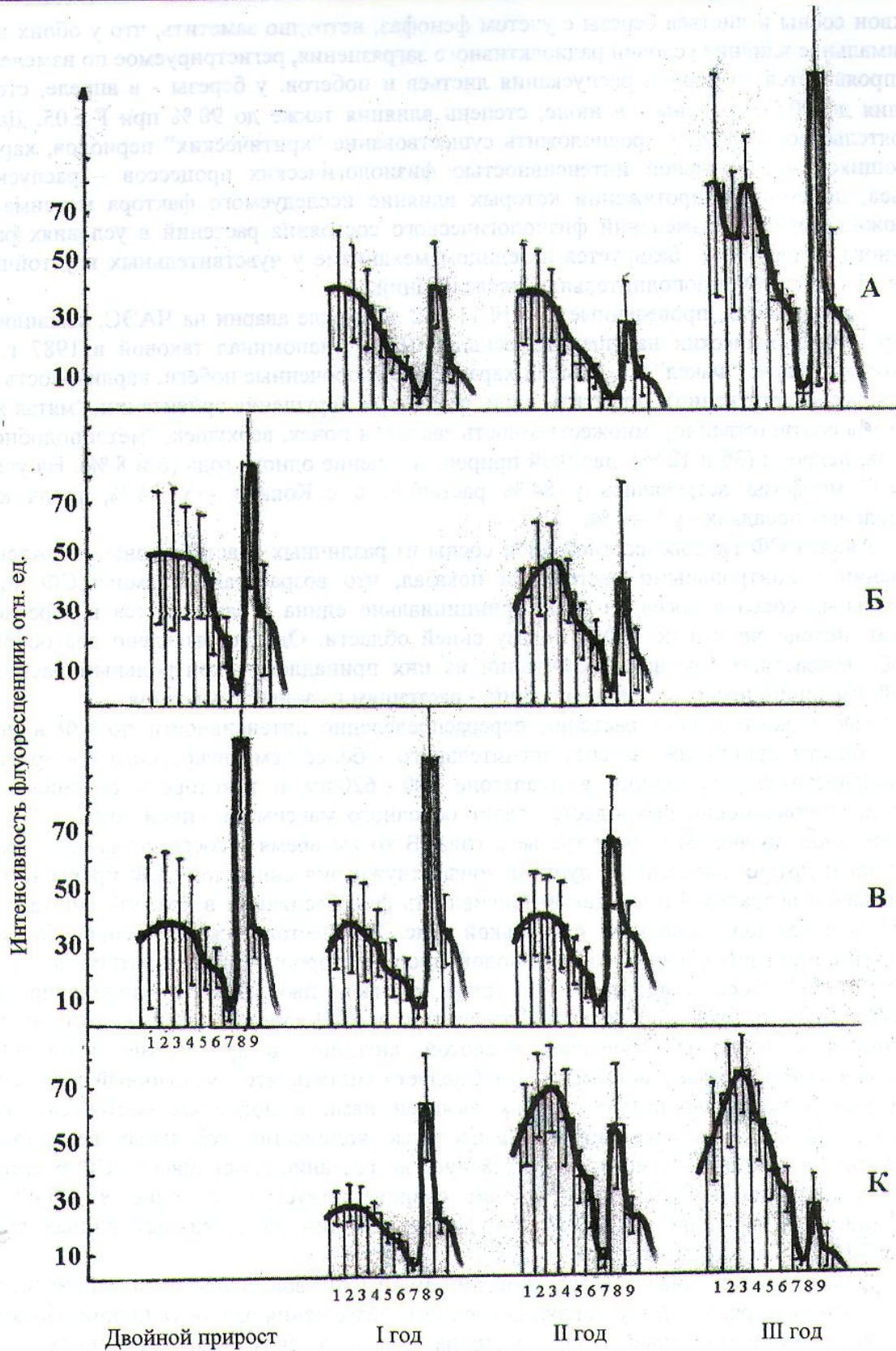


Рис. 2. Распределение интенсивности флуоресценции на отдельных длинах волн в зависимости от возраста хвои. К - контроль, А, Б - спектры флуоресценции хвои сосны с радиоморфозами, В - спектры флуоресценции хвои сосны без радиоморфозов. 1 - 400 нм; 2 - 420 нм; 3 - 440 нм; 4 - 460 нм; 5 - 500 нм; 6 - 520 нм; 7 - 620 нм; 8 - 685 нм; 9 - 720 нм.

этим данным дозовым нагрузкам. Установлено, что накопление  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  носит независимый характер: так, если максимальная удельная активность  $^{137}\text{Cs}$  обнаруживается независимо от места произрастания в молодой хвое (а в старой хвое она на 1 - 2 порядка меньше), то удельная активность  $^{90}\text{Sr}$  практически линейно увеличивается с возрастом хвои. В то же время в одновозрастной хвое между этими изотопами выявлена достоверная положительная корреляция: коэффициент корреляции для хвои I года составляет 0,73, для II года - 0,65 при  $F \geq 0,5$ , т.е. большему абсолютному количеству  $^{137}\text{Cs}$  соответствует и большее количество  $^{90}\text{Sr}$ .

Комплексный анализ флуоресцентных, биометрических, радиологических и биохимических параметров с введением их в корреляционную матрицу в качестве признаков позволил установить, что все эти параметры характеризовались разнообразными и существенными связями.

Обнаружены различия во влиянии инкорпорированных  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  на отдельные зоны СФ. Так, изменения синей зоны СФ хвои I и II годов можно связать с действием именно  $^{137}\text{Cs}$  ( $r_I = 0,72 - 0,74$ ;  $r_{II} = 0,61$ ), тогда как влияние  $^{90}\text{Sr}$  на СФ выявляется у хвои II года и направлено на зеленую ( $r_{520} = 0,84$ ) и красную ( $r_{680} = 0,61$ ) зоны.

Установлена достаточно высокая связь между удельной активностью  $^{90}\text{Sr}$  и потенциальной интенсивностью фотосинтеза, независимая от возраста хвои ( $r_I = 0,71$ ,  $r_{II} = 0,77$ ), а также с биоэлектрической активностью ( $r_I = 0,7$ ,  $r_{II} = 0,86$ ). Для  $^{137}\text{Cs}$  эта связь слабо выражена.

Показано, что накопление фотосинтетических пигментов, в первую очередь хлорофилла *a* и суммы каротиноидов, также находится в связи с удельной активностью изотопов ( $r$  изменяется в пределах 0,5 - 0,56). Анализ содержания пигментов в хвое в связи с уровнем радиационного загрязнения показал, что малые уровни стимулируют накопление данных пигментов (но не хлорофилла *b*), а средние и высокие пропорционально угнетают этот процесс.

Таким образом, исследованные радиоизотопы оказывают многообразное влияние на физиологические, биофизические и прочие характеристики сосны, что выражается в результирующих изменениях СФ. Анализ СФ разновозрастной хвои может быть использован в качестве тест-метода для обнаружения загрязнения радионуклидами  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$ . Основными диагностическими признаками могут служить "стабильность" синей зоны СФ и местоположение синего максимума.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гродзинский Д.М. Биологическое действие ионизирующей радиации // Биофизика / Под ред. П.Г. Костюк. - Киев: Вища шк., 1988. - С. 387 - 433.
2. Мовчан Я.И., Каневский В.А., Семичаевский В.Д. и др. Фитоиндикация в дистанционных исследованиях. - Киев: Наук. думка, 1993. - 306 с.
3. Карнаухов В.Н., Керженцев А.Г., Яшин В.А. Люминесцентный метод биоиндикации состояния экосистем. - Пущино, 1982. - 24 с. - (Препр. / ОНТИ НЦ БН СССР).
4. 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.
5. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. - М.: Мир, 1965. - С. 219 - 262.
6. Брайон А.В. Флуоресцентная микроскопия растительных тканей и клеток. - Київ: Вища шк., 1973. - 108 с.
7. Левчик О.І., Гонтаренко О.В., Пушкарьова А.Г. та ін. Флуоресценція рослин в умовах надлишку важких металів // Укр. ботан. журнал. - 1990. - Т. 47, № 3. - С. 54 - 60.
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. Subhash N., Wenzel O., Lichtenthaler H.K. Changes in Blue-Green and Chlorophyll Fluorescence Emission and Fluorescence Ratios during Senescence of Tobacco Plants // Remote Sence. Environ. - 1999. - Vol. 69. - P. 215 - 223.

10. Левчик Е.И., Сваричевская Е.В., Бекирова Г.О. и др. Результаты исследования спектров флуоресценции березы и дуба из 30-километровой зоны ЧАЭС // Зб. наук. праць ІЯД. - 2001. - № 1(3). - С. 164 - 170.
11. А. с. № 1701047, 1991. Способ определения содержания плутония, продуктов деления урана и трансурановых элементов в окружающей среде / В.А. Агеев, А.А. Ключников, А.А. Одинцов и др.
12. Гусев М.В. Малый практикум по физиологии растений. - М.: Изд-во МГУ, 1982. - 192 с.
13. Вознесенский В.М., Зеленский О.В., Семихатова О.В. Методы исследования фотосинтеза и дыхания растений. - М.-Л.: Наука, 1965. - 305 с.
14. Крилицкий Г.Т. Биоэлектрический метод определения жизнеспособности древесных растений на начальных этапах онтогенеза. - Баку, 1990. - 61с. - (Препр.; № 85).
15. Gouglas, Y., Moya I., Schtuck Y. Time-resolved spectroscopy of the blue fluorescence of spinach leaves // Photosynth. Res. - 1990. - Vol 25. - P. 299 - 307.

## ІНДУКОВАНА ЛАЗЕРОМ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ ХВОЇ СОСЕН, ЩО РОСТУТЬ В УМОВАХ ЗАБРУДНЕННЯ РАДІОНУКЛІДАМИ ЧОРНОБИЛЬСЬКОГО ПОХОДЖЕННЯ

О. І. Левчик, О. В. Сваричевська, Л. В. Скрипка, М. Д. Кучма, В. К. Зайка

Наведено результати багаторічних досліджень спектрів індукованої лазером флуоресценції (СФ) хвої сосен, що ростуть в умовах забруднення радіонуклідами чорнобильського походження. Проведено комплексний аналіз флуоресцентних, біометричних, радіологічних та біохімічних параметрів хвої. Виявлено відмінності у впливі інкорпорованих радіонуклідів  $^{137}\text{Cs}$  і  $^{90}\text{Sr}$  на окремі зони СФ хвої. Показано, що аналіз СФ різновікової хвої може бути використано як тест-метод для виявлення забруднення радіонуклідами  $^{137}\text{Cs}$  і  $^{90}\text{Sr}$ .

## LASER-INDUCED FLUORESCENCE OF PINE (NEEDLES) GROWING IN THE CONDITIONS OF POLLUTION WITH RADIONUCLIDS OF CHERNOBYL ORIGIN

E. I. Levchick, E. V. Svarichevslaya, L. V. Skripka, N. D. Kuchma, V. K. Zaika

The results of a long-term research of the spectra of laser-induced fluorescence (hereafter-SF) of pine (needles) growing in the conditions of Chernobyl origin radionuclides pollution are presented. A complex analysis of fluorescent, biometric and radiological biochemical parameters of pine needles has been performed. Changes in the impact of incorporated radionuclides  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$  on certain zones of pine SF needles have been detected. It has been shown that the analysis of different-age pine SF needles can be used as a test-method for detection of pollution with  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$  radionuclides.

Поступила в редакцію 28.04.01