

Adaptacja glonów *Desmodesmus subspicatus* i makrofitów *Lemna minor* do warunków łącznego działania herbicydów MCPA i chlorydazonu

Joanna Bisewska

Określano toksyczność herbicydów kwasu 2-metylo-4-chlorofenoksyoctowego (MCPA) i 5-amino-4-chloro-2-fenylpirydazyn-3-onu (CHD) oraz ich mieszanin wobec *Lemna minor* (liczba członów pędowych, tempo wzrostu, powierzchnia, świeża i sucha masa pojedynczego członu pędowego, zawartość chlorofilu *a* i *b* w członie pędowym, fluorescencja chlorofilu *a*) oraz *Desmodesmus subspicatus* (gęstość populacji, tempo wzrostu, wielkość komórki).

W badaniach z *L. minor* stosowano testy toksykologiczne zgodne ze standardem ISO20079:2005. Hodowle rzęsy prowadzono w następujących warunkach: $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, światło ciągle jarzeniowe o natężeniu $105\pm 10\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ścianki boczne oraz dna naczyń hodowlanych (zlewki o pojemności $250\ \text{cm}^3$) zaciemniono. Inoculum wynosiło 12 członów pędowych (4x3-członowe osobniki). Liczbę członów pędowych określano w 2, 4 i 7 dniu hodowli. Pozostałych pomiarów dokonywano w ostatnim (7) dniu trwania doświadczenia. Natomiast glony hodowano w dwóch systemach. Prowadzono testy toksykologiczne zgodne ze standardem ISO 8692:2004 w warunkach: $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, światło ciągle jarzeniowe o natężeniu $105\pm 10\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, kolba stożkowa o pojemności $100\ \text{cm}^3$, inoculum 10^4 komórek/ cm^3 oraz prowadzono hodowle intensywne, stale napowietrzane w warunkach: $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, $105\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, probówka $200\ \text{cm}^3$, inoculum 10^6 komórek/ cm^3 , pożywka BBM. Pomiarów liczby komórek dokonywano w 24, 48 i 72 godzinie testu. Tempo wzrostu (*r*) kontrolnej populacji *Lemna* wyniosło $0,288\ \text{d}^{-1}$, zaś *Desmodesmus* – $1,51\ \text{d}^{-1}$. Spełnione zostało zatem zasadnicze kryterium ważności wymienionych testów toksykologicznych, określające minimalne *r* badanych organizmów – $0,275$ (rzęsa) oraz $1,4$ (glony) d^{-1} .

Na podstawie reakcji wzrostowej glonów, zależnej od stężenia MCPA (95, 171, 309, 554 i $1000\ \text{mg/dm}^3$) i CHD (2, 4 i $8\ \text{mg/dm}^3$) wyznaczono wartości wskaźników ekotoksykologicznych EC_{10} i EC_{50} . Dla MCPA wyniosły one odpowiednio: 142,7 oraz $529,1\ \text{mg/dm}^3$, zaś dla CHD – 1,7 oraz $5,1\ \text{mg/dm}^3$. Wyniki te świadczą o stukrotnie większej toksyczności chlorydazonu niż MCPA wobec badanych glonów. CHD w stężeniu EC_{50} okazał się być algicydalny po 72 godzinach ekspozycji komórek stale napowietrzanych.

W przypadku rzęsy EC_{10} ($\text{EC}_{10} = 0,8\ \text{mg/dm}^3$ dla MCPA oraz $0,7\ \text{mg/dm}^3$ dla CHD) oraz EC_{50} ($5,4\ \text{mg/dm}^3$ dla MCPA oraz $10,4\ \text{mg/dm}^3$ dla CHD) świadczą o stosunkowo

niewielkich różnicach w toksyczności MCPA i CHD wobec tego makrofitu. Jednocześnie wskazują rzęsę, jako organizm dużo bardziej podatny na szkodliwe działanie MCPA, niż glony.

Lemna minor oraz *Desmodium subspicatus* eksponowano na działanie mieszanin MCPA i CHD w następujących kombinacjach: EC₁₀MCPA+EC₁₀CHD, EC₅₀MCPA+EC₁₀CHD, EC₁₀MCPA+EC₅₀CHD, EC₅₀MCPA+EC₅₀CHD. Każda z zastosowanych mieszanin powodowała hamowanie wzrostu obu organizmów nie tylko w porównaniu do kontroli, ale również w stosunku do pojedynczo działających herbicydów. Stopień toksyczności kombinacji zależał przede wszystkim od badanego gatunku, czasu ekspozycji oraz mierzonego parametru. Inhibicję wytwarzania członów pędowych rzęsy przez herbicydy oraz ich mieszaniny notowano po 4 dniach ekspozycji. Natomiast spadek gęstości populacji glonów miał miejsce po 48 godzinie od aplikacji EC₁₀MCPA, EC₅₀MCPA, EC₁₀CHD oraz EC₁₀MCPA+EC₁₀CHD. Pozostałe warianty znacząco redukowały tempo wzrostu zielenicy już między 0 a 24 godziną hodowli. Liczba członów pędowych *Lemna* była mniejsza o ok. 35 %, zaś tempo wzrostu o ok. 20 % pod wpływem działania EC₁₀MCPA+EC₁₀CHD oraz o ok. 60 % (liczba) i 40-50 % (tempo) w pozostałych mieszaninach. Z kolei liczba komórek *Desmodium* w wariantach EC₁₀MCPA+EC₁₀CHD, EC₅₀MCPA+EC₁₀CHD, EC₁₀MCPA+EC₅₀CHD, EC₅₀MCPA+EC₅₀CHD była mniejsza o odpowiednio ok. 50, 70, 95 i 95 %, zaś tempo ulegało redukcji o ok. 15, 35, 70 i 72 % w stosunku do kontroli.

Pod wpływem działania MCPA i CHD oraz ich mieszanin notowano mniejszą powierzchnię członów pędowych rzęsy w porównaniu do kontroli. Mniejszy w stosunku hodowli nietraktowanej przyrost świeżej i suchej masy pojedynczego członu pędowego notowano po ekspozycji *Lemna* na EC₅₀CHD, EC₁₀MCPA+EC₅₀CHD oraz EC₅₀MCPA+EC₅₀CHD, przy czym człony pędowe w wymienionych mieszaninach charakteryzowały się jednak większym przyrostem masy w stosunku do pojedynczo działającego CHD. EC₅₀CHD przyczyniało się do ok. 80 % stymulacji zawartości chlorofilu *a* bez wpływu na chlorofil *b*. Natomiast każda badana mieszanina powodowała znaczący wzrost stosunku chlorofilu *a* do chlorofilu *b*.

Pod wpływem działania MCPA (niezależnie od stężenia) notowano ok. 40 % wzrostu wartości współczynnika wygaszania niefotochemicznego (qNP). W przeciwieństwie do MCPA, CHD obniżał maksymalną wydajność kwantową PSII prób adaptowanych do ciemności (F_v/F_m), maksymalną wydajność kwantową anten PSII (F_v'/F_m') oraz rzeczywistą wydajność kwantową prób adaptowanych do ciemności (Φ_{PSII}). CHD powodował także

obniżenie wartości współczynnika wygaszania fotochemicznego (qP) i niefotochemicznego (qNP) oraz znaczny wzrost wartości fluorescencji zerowej (F_0). Efekty działania CHD silniej zaznaczały się po zastosowaniu wyższego stężenia. Pod wpływem działania mieszanin obu stężeń MCPA z EC_{10} CHD zanotowano jedynie spadek wartości współczynnika qNP (ok. 15 %) oraz wzrost F_0 (ponad 57 %) w porównaniu do kontroli. Z kolei pod wpływem działania kombinacji EC_{10} MCPA+ EC_{50} CHD i EC_{50} MCPA+ EC_{50} CHD wartość F_0 wzrosła ponad dwukrotnie, zaś wartości wszystkich pozostałych parametrów były znacząco niższe w porównaniu do kontroli i pojedynczo działającego MCPA oraz wyższe (nieistotnie statystycznie) w stosunku do EC_{50} CHD.

Charakterystyczne dla pojedynczo działających EC_{50} MCPA i EC_{50} CHD wobec *Desmodesmus* była ok. 20 % stymulacja wielkości komórki w porównaniu do kontroli, podczas gdy pod wpływem łącznego ich działania komórki glonów były o ok. 30 % mniejsze.

Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wskazują, że występowanie interakcji między MCPA i CHD zależało od badanego organizmu oraz stężeń herbicydów tworzących mieszaninę. W przypadku rzęsy stwierdzono, że współdziałanie zachodziło głównie w kombinacjach MCPA z wyższym stężeniem CHD (liczba członów pędowych, tempo wzrostu, powierzchnia członów pędowych, świeża masa i stężenie Chl *a*). Natomiast w badaniach z *Desmodesmus* interakcja między badanymi herbicydami zachodziła w mieszaninach EC_{10} CHD+ EC_{50} MCPA (wielkość komórki) oraz EC_{50} CHD+ EC_{50} MCPA (wielkość komórki, gęstość populacji) w hodowlach ISO oraz w mieszaninie EC_{10} CHD+ EC_{50} MCPA (gęstość populacji, tempo wzrostu) w hodowlach napowietrzanych. Wartości współczynnika RI (model Abbotta) wskazują na antagonistyczne współdziałanie MCPA i CHD względem *Lemna*, addycję (hodowle ISO) oraz synergizm (hodowle napowietrzane) wobec glonów. Ze względu na stymulację wielkości komórek glonów po ekspozycji na wyższe stężenia herbicydów, niemożliwe było określenie charakteru interakcji w działaniu kombinacji EC_{50} MCPA+ EC_{50} CHD.

W pracy badano aktywność enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy askorbinianowej (APX) oraz katalazy (CAT) – w komórkach *Lemna* i *Desmodesmus* poddanych działaniu MCPA, CHD oraz ich mieszanin. Całkowita aktywność enzymów nie ulegała zmianie w komórkach rzęsy, natomiast u glonów znacząco rosła. Ekstremalną, blisko 8-krotną stymulację aktywności SOD oraz 26-krotną indukcję APX notowano w komórkach *Desmodesmus* po 48 godzinach ekspozycji na działanie kombinacji EC_{10} CHD+ EC_{50} MCPA. Natomiast aktywność CAT wzrosła niemal 37-krotnie pod wpływem 48-godzinnej ekspozycji na działanie mieszaniny EC_{50} CHD+ EC_{50} MCPA.

W doświadczeniach z *Lemna* badano aktywność poszczególnych izoform enzymów. Stwierdzono, że w komórkach rzęsy obecne są 4 izoenzymy SOD (Mn-SOD I, Mn-SOD II, Cu/Zn-SOD oraz Fe-SOD), 6 izoform APX (APX I, APX II, APX III, APX IV, APX V oraz APX VI) oraz jedna izoforma CAT. Poszczególne izoformy różniły się aktywnością. Spośród SOD najbardziej aktywna była Fe-SOD, następnie Cu/Zn-SOD, Mn-SOD I, zaś Mn-SOD II wykazywała najniższą aktywność. Działanie MCPA, CHD oraz ich mieszanin na badane izoformy zależne były od czasu ekspozycji. Obserwowano zarówno brak wpływu, jak również efekty hamujące i stymulujące.

Otrzymane wyniki wskazują, iż MCPA i CHD oraz ich mieszaniny silnie indukują stres oksydacyjny w komórkach *Desmodesmus*, który w komórkach *Lemna* ma raczej niewielki, lokalny i przemijający charakter. Odmienna odpowiedź obu organizmów po ekspozycji na mieszaniny MCPA i CHD, widoczna w zmianach aktywności enzymów antyoksydacyjnych, w zestawieniu z efektami działania pojedynczych herbicydów, można uznać za przyczynę synergizmu w oddziaływaniu na glony oraz antagonizmu w oddziaływaniu na rzęsę.

W komórkach rzęsy oznaczono zawartość białek Hsp70. Stwierdzono obecność cytoplazmatycznej (Hsp70 cyt.) oraz stromalnej (Hsp70B) izoformy tego białka. MCPA, CHD oraz ich mieszaniny powodowały wzrost zawartości Hsp70 cyt. w zakresie od 20 do 120 % kontroli. Wyjątek stanowiły tu warianty z zastosowaniem EC₅₀CHD, gdzie notowano znacząco mniejszą zawartość białka w porównaniu do kontroli (o ok. 30% w 4 dobie i o ok. 50% w 7 dniu). Zawartość Hsp70B była znacząco większa pod wpływem 2-dniowego działania EC₅₀MCPA+EC₁₀CHD, 4-dniowego działania EC₁₀ i EC₅₀MCPA oraz wszystkich wariantów z EC₁₀CHD. Notowano również spadek ilości Hsp70B po 2- i 4-dniowej ekspozycji rzęsy na EC₅₀CHD (pojedynczo i w mieszaninach), zaś w 7 dniu w tych próbach zawartość Hsp70B była porównywalna do prób kontrolnych.