

UNIWERSYTET WROCŁAWSKI  
WYDZIAŁ NAUK PRZYRODNICZYCH  
BIOLOGIA

Piotr Baszucki

**Wpływ preparatów antyglonowych na wybrane grupy roślin  
wodnych**

Praca magisterska

Wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin  
Instytutu Biologii Roślin pod opieką  
dr Marka Burzyńskiego

Wrocław 2005

## Spis treści

Spis fotografii i wykresów	3
Rozdział I. Wstęp	4
1. Rośliny wodne i glony – wiadomości ogólne	4
2. Preparaty antyglonowe	7
2.1 Charakterystyka najpopularniejszych preparatów antyglonowych	7
2.2 Obserwacje dotyczące wpływu antyglonów na rośliny akwariowe	9
3. Miedź a rośliny wodne	11
3.1 Miedź w wodach naturalnych i akwarium	11
3.2 Pobieranie i akumulacja miedzi w roślinach wodnych	13
3.3 Mechanizmy odpornościowe na miedź	15
4 Cel pracy	17
Rozdział II. Materiały i metody	18
1 Warunki hodowli i materiał roślinny	18
2 Metodyka pomiarów	18
2.1 Analiza stężenia chlorofilu w glonach	19
2.2 Pomiar plonowania <i>Lemna minor</i>	20
2.3 Pomiar parametrów fotosyntetycznych	21
2.4 Analiza zawartości miedzi	22
Rozdział III. Wyniki	23
1 Wpływ preparatów antyglonowych na wzrost glonów <i>Pediastrum</i>	23
2 Wpływ preparatów na polowanie <i>Lemna minor</i>	23
3 Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną <i>E. pellucidus</i>	25
4 Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną <i>L. laevigatum</i>	26
5 Wpływ preparatów na wzrost i zawartość miedzi u <i>L. laevigatum</i>	28
Rozdział IV. Dyskusja	32
1 Wpływ preparatów antyglonowych na wzrost glonów <i>Pediastrum</i>	32
2 Wpływ preparatów na polowanie <i>Lemna minor</i>	34
3 Dyskusja nad metodyką doświadczeń z roślinami wodnymi	35
4 Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną <i>E. pellucidus</i>	36
5 Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną <i>L. laevigatum</i>	37
6 Wpływ preparatów na wzrost i zawartość miedzi u <i>L. laevigatum</i>	38
Rozdział V. Wnioski	39
Rozdział VI. Podziękowania	40
Literatura	41
Summary	44

## Spis fotografii i wykresów

Wykres 1 (a, b). Wpływ preparatów na zawartość chlorofilu a i b w glonach z rodzaju <i>Pediastrum</i> .....	23
Wykres 2 (a, b). Wpływ preparatów na świeżą masę <i>Lemna minor</i> .....	24
Wykres 3 (a, b). Potencjalna wydajność PSII u <i>Echinodorus pellucidus</i> .....	25
Wykres 4 (a, b). Aktualna wydajność PSII u <i>Echinodorus pellucidus</i> .....	25
Wykres 5 (a, b). Wydajność fotosyntezy netto u <i>Echinodorus pellucidus</i> .....	26
Wykres 6 (a, b). Potencjalna wydajność PSII u <i>Limnobiium laevigatum</i> .....	27
Wykres 7 (a, b). Aktualna wydajność PSII u <i>Limnobiium laevigatum</i> .....	27
Wykres 8 (a, b). Wydajność fotosyntezy netto u <i>Limnobiium laevigatum</i> .....	27
Wykres 9. Zawartość miedzi w pożywce z <i>Limnobiium laevigatum</i> po 14 dniach doświadczenia.....	28
Wykres 10 (a, b). Zawartość miedzi na gram suchej masy w <i>Limnobiium laevigatum</i> .....	28
Wykres 11 (a, b). Zawartość miedzi na jedną roślinę <i>Limnobiium laevigatum</i> .....	29
Wykres 12. Sucha masa liści i korzeni na jedną roślinę <i>Limnobiium leavigatum</i> .....	29
Wykres 13. Sucha masa liści i korzeni na jedną roślinę <i>Limnobiium laevigatum</i> w procentach kontroli.....	30
Fotografia 1 (a, b, c, d). Wpływ preparatów na morfologię <i>Lemna minor</i> .....	24
Fotografia 2. Wpływ preparatów na morfologię korzeni <i>Limnobiium leavigatum</i> .....	30
Fotografia 3 (a, b, c). Wpływ preparatów na morfologię liści <i>Limnobiium leavigatum</i> .....	31

# I. Wstęp

## 1. Rośliny wodne i glony – wiadomości ogólne

Współczesne rośliny wodne wraz z glonami, odgrywają znaczącą rolę w przypadku gospodarki człowieka. Rolę tę zawdzięczają głównie zjawisku fitoremediacji, dzięki któremu są w stanie akumulować znaczne ilości szkodliwych substancji znajdującej się w ściekach czy odpadach przemysłowych. Dlatego też niezbędnym składnikiem nowoczesnych oczyszczalni ścieków są m.in. sektory wyznaczone do uprawy roślin wodnych, które poprzez swoiste procesy biologiczne przyswajają znaczne ilości m.in. metali ciężkich.

Rośliny wodne odgrywają ważną rolę w produkcji tlenu, obiegu pierwiastków w przyrodzie, kontrolowaniu jakości wody, stabilizacji osadów i tworzeniu środowiska oraz ochrony dla organizmów wodnych. Ponadto fitoplankton, bentos i glony epifitowe wraz z makrofitami są głównym źródłem energetycznym dla większości ekosystemów wodnych. Zmiany w dynamice roślin wodnych mają efekt nie tylko na ich bezpośrednie otoczenie ale również na jakość wody pitnej czy wykorzystywanej w celach przemysłowych czy rekreacyjnych.

Środki antyglonowe wraz z preparatami do zwalczania ślimaków, nawozami makro- i mikroelementowymi, uzdatniaczami wody czy lekami dla ryb zalicza się do grupy preparatów akwarystycznych popularnie stosowanych we współczesnej akwarystyce.

Od dawna akwarysta stawał przed wyborem – regulować biologię zbiornika za pomocą znanych metod naturalnych (co wymaga zaplecza wiedzy) czy stosować szeroko reklamowane preparaty akwarystyczne, z definicji mające mu tę czynność ułatwić. Najczęściej jednak okazuje się, że nie uda się zapanować nad żywym ekosystemem bez znajomości najważniejszych procesów ekologicznych i fizjologicznych. Zapewne to czyni akwarystykę dziedziną wyjątkową, w której relaks i satysfakcja idą w parze z szeroko pojętym biologicznym poznaniem.

Znane współcześnie preparaty antyglonowe reklamowane są jako środki nieszkodliwe dla zwierząt i roślin zamieszkujących akwarium. O ile dla akwarysty posiadającego akwarium tzw. „ogólne” (ze znacznym udziałem ryb w stosunku do roślin) ujemny wpływ tych preparatów może nie być w ogóle odczuwalny, o tyle dla

osób uprawiających rośliny wodne, posiadających akwarium tzw. "roślinne" – wpływ ten może nie być bez znaczenia, przede wszystkim ze względu na większą wrażliwość roślin w stosunku do ryb. Wykazano, że rośliny pływające są bardziej wrażliwe niż ryby na szereg metali ciężkich (Wang, 1986), ścieki (Taraldsen i Norberg-King, 1990) i pestycydy (Alexander i Hughes, 1993), ale nie na detergenty (Bishop i Perry, 1981) i kilka organików (Cowgill i wsp. 1991) To właśnie jeden z metali ciężkich – miedź, jest od wielu lat stosowany jako składnik licznych preparatów antyglonowych, których celem jest ograniczanie populacji glonów w ekosystemach akwarium.

Należy mieć na uwadze, że od wielu lat to właśnie ryby akwariowe były synonimem akwarystyki i to głównie na nich skupiano uwagę opracowując składy różnorodnych preparatów akwarystycznych. Obecnie jednak, w dobie bardzo szerokiego dostępu do zaawansowanej techniki, coraz większą rzeszę entuzjastów zyskują sobie „podwodne ogrody”, w których coraz częściej goszczą gatunki delikatne, o dużej wrażliwości na różnorodne warunki stresowe.

Rośliny wodne są reprezentowane przez różnorodne odmiany glonów i makrofitów wodnych występujących w różnych środowiskach. Pomimo tego rośliny wodne stanowią niewielki odsetek organizmów, na podstawie których testy fitotoksyczności stanowią podstawę do podejmowania ważnych decyzji związanych z danym zbiornikiem wodnym (oprócz badań na wpływ pestycydów – ale to wydaje się oczywiste). Rośliny pływające są zwykle częściej używane w testach na fitotoksyczność w porównaniu do typowych ukorzenionych roślin wodnych. Coraz częściej jednak ze względu na zwrócenie uwagi na jakość osadów dennych – w testach takich uwzględnia się przede wszystkim rośliny ukorzenione w podłożu.

Wrażliwość roślin pływających w odniesieniu do glonów nie jest tak prosta jak by mogło się wydawać. Teoretycznie, z racji tego, że wiele gatunków roślin pływających jest używanych do usuwania szkodliwych substancji z wody, powinniśmy spodziewać się mniejszej wrażliwości roślin pływających niż glonów. Powinny one być generalnie bardziej odporne na działanie metali i innych substancji toksycznych. Jednak bazując na literaturze – nie ma w tym przypadku jasnych trendów.

Makrofity wodne są wykorzystywane w testach na toksyczność o wiele rzadziej niż glony. Szacuje się, że jedynie 7% z 528 testów fitotoksyczności opierało się na badaniach nad gatunkami makrofitów wodnych (Blanc i wsp., 1978). Dzieje się tak z uwagi na to, że makrofity wodne wykazują często różnorodność pomiędzy replikantami i są zwykle trudniejsze w kontrolowaniu podczas doświadczeń.

Główną rolę w oczyszczaniu wód powierzchniowych pełni właśnie fitoplankton – zarówno w rzekach, jeziorach jak i oceanach. Fitoplankton jest w stanie wpłynąć na zawartość metali w wodzie poprzez różne mechanizmy powodujące strącanie metali w postaci nieszkodliwych związków (Salomons i Mook, 1980) oraz wiązanie metali w biomacie czy detrytusie glonów. Poza mikrobiologiczną transformacją żelaza (Madson et al., 1986) w pierwszych latach XXI wieku nie poświęcano dotąd zbyt wiele uwagi biologicznej kontroli unieszkodliwiania metali w zbiornikach słodkowodnych.

W akwarium glony są organizmami zgoła niepożądanymi, przede wszystkim z racji ich małych walorów estetycznych (choć są wyjątki jak choćby *Cladophora glomerata*). Ponadto glony porastają powierzchnię liści roślin szpecąc je i utrudniając wegetację (absorbując jonów przez powierzchnię epidermy, ograniczają docieranie fotonów światła do wewnętrznych struktur liści).

U glonów występują następujące barwniki fotosyntetyczne: chlorofil a, b, c (c1, c2) oraz d. Wykorzystane w pracy glony z rodzaju *Pediastrum* zawierają wyłącznie chlorofil a i b, a stężenie tych barwników posłużyło do oceny plonowania tych glonów (Gumiński, 1990). Biosynteza chlorofili u sinic i autotroficznych glonów przebiega identycznie jak u roślin wyższych (Gumiński, 1990). Glony są zwykle eksponowane na wpływ niekorzystnego czynnika nieco inaczej niż np. rośliny pływające. Te pierwsze, szczególnie jednokomórkowe zielenice, są rozprzestrzenione w całym słupie wody, podczas gdy rośliny pływające zasiedlają jedynie jej obszar przypowierzchniowy (Fairchild i wsp. 1997). Nie jest to bez znaczenia w przypadku naturalnych metod walki z ich zakwitami.

## 2. Preparaty antyglonowe

### 2.1 Charakterystyka najpopularniejszych preparatów antyglonowych

Na rynku akwarystycznym dostępna jest rzesza różnorodnych preparatów antyglonowych. Na potrzeby pracy przebadano wstępnie kilka najpopularniejszych i poddano je próbom wpływu na plonowanie glonów z rodzaju *Pediastrum* oraz makrofitu *Lemna minor*. Po wstępnych szacunkach do dalszych, szczegółowych badań wybrano preparaty: ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>.



**Tetra AlguMin<sup>®</sup>** (250ml, dawkowanie 1ml/2l)– preparat jest wyciągiem z torfu. Badanie spektroskopii atomowej nie wykazało w nim obecności miedzi. Jest to środek, który skutecznie wpływa na zwalczanie flory glonowej w akwariach. Zawarte w nim humusy obniżają pH wody, dodatkowo chelatują inne pierwiastki przydatne do vegetacji roślin, dzięki czemu nie mogą być efektywnie pobierane przez glony, które przegrywają w ten sposób konkurencję pokarmową z roślinami wyższymi.

By podkreślić skuteczność wyciągów torfowych przytoczyć można praktyczne doświadczenie, jakie zostało zastosowane w Ogrodzie Botanicznym we Wrocławiu, gdzie w celu zwalczania glonów w akwariach wprowadzono preparat wyprodukowany w Instytucie Torfowym w Elblągu. Użyty do tego celu proszek rozsypywano na powierzchni wody w ilości 1,25 g na 1 litr wody. Przy opadaniu proszku woda po czasie 1/2 godziny nabierała barwy mocnej herbaty. Już po 30 godzinach zaobserwowano odpadanie sinic (*Cyanophytae*) z liści roślin. Po 10 dniach rośliny i szyby były już zupełnie oczyszczone z glonów. Mimo tak radykalnego toksycznego działania kwasu humusowego obserwowano działanie stymulujące na rośliny wyższe, które nie wykazywały zahamowania wzrostu (Gumiński, 1990). Według Gumińskiego glony *Pediastrum* są przykładem glonów, które reagują pozytywnie na kwasy humusowe. Generalnie związki próchniczne chelatują wielowartościowe jony metali, ułatwiają pobieranie żelaza i fosforu a utrudniają pobierania wapnia i miedzi (Gumiński, 1986).

**Tetra Algizit<sup>®</sup>** (10 tabletek, 1 tabletki/40l) – preparat w postaci rozpuszczalnych tabletek. Po rozpuszczeniu barwi wodę na lekko błękitny kolor. Czynnikiem aktywnym jest monuron (20mg/tabl) – (herbicyd, pochodna mocznika) o niepotwierdzonym działaniu kancerogennym (o czym informują na opakowaniu-„ograniczone dowody na jego rakotwórcze działanie”). Wiele danych wskazuje na to, że glony nie są w stanie wytworzyć tolerancji na tę substancję (nawet po przeniesieniu materiału na czystą pożywkę, efekt monuronu był nieodwracalny). Pochodne mocznika (monuron, diuron) nie należą do najefektywniejszych pestycydów ograniczających plonowanie glonów (Brown i Lean, 1995).



Według instrukcji producenta – zwalczą glony natychmiastowo i duże ich ilości. Producent zaleca umieszczanie tabletki w miejscu gdzie nie ma roślin i występuje stały ruch wody sugerując tym samym szkodliwy wpływ preparatu na rośliny. Z tego powodu zrezygnowano z jego kandydatury do badań.



**ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup>** (opakowanie 10ml, dawkowanie 1ml/20l) – bezbarwny płyn, bez zapachu o bardzo silnym działaniu. Według instrukcji już 5ml preparatu wystarcza do zwalczenia glonów w 100-litrowym zbiorniku. Zgodnie z informacją na opakowaniu powinien wykazywać działania hamujące wzrost glonów planktonowych, brunatnic a nawet sinic. Nie zawiera miedzi a czynnik działania ze względu na tajemnicę firmy jest mi nieznany. Po wstępnych

doświadczeniach przy obserwacjach makroskopowych i na bazie pomiaru świeżej masy *Lemna minor* – stosunkowo mało szkodliwy

**ZMF ALGO-stop depot<sup>®</sup>** (opakowanie 12 tabletek). Według zapewnień producenta działa na glony nitkowate i pędzelkowate. Z racji braku sterylnej materiału badawczego opowiadającego docelowemu działaniu preparatu (glonów nitkowatych) – zrezygnowano z jego testowania.







**Tropical Algin<sup>®</sup>** (dawkowanie: 1ml/10l). Jeden z najczęściej stosowanych preparatów antyglonowych w kraju, zwłaszcza przez początkujących akwarystów. To produkt naszego rodzimego producenta, który według zaleceń ogranicza rozwój zielonych glonów. Niska cena produktu sugeruje użycie łatwo dostępnego i taniego składnika antyglonowego tak jest też w rzeczywistości, gdyż preparat ten oparty jest na bazie pięciowodnego siarczanu miedzi produkowanego m.in. przez Gliwickie Polskie Odczynniki Chemiczne (dane ze strony:

<http://www.bip.urpl.gov.pl/uploadedDocuments/biob.htm>). Istnieje pogląd, że powoduje on uwalnianie toksyn do wody i pogarsza jej właściwości chemiczne, ponadto jest przyczyną tak zwanych wtórnych zakwitów (Ogłęcki, 2005) Większość glonów wykazuje wrażliwość na zwiększoną zawartość miedzi w wodzie, np. zielenica *Spirogyra* nie toleruje obecności miedzi (Gumiński, 1990).

## 2.2 Obserwacje dotyczące wpływu antyglonów na rośliny akwariowe

Wieloletnia praktyka akwarystyczna potwierdza negatywny wpływ preparatów antyglonowych na rośliny wyższe. Przez laików określane jest ono zwykle jako „gnicie roślin” – trudno jest opisać je dokładniej gdyż niekorzystne objawy charakteryzują się szerokim spektrum od pojawów chlorotycznych, po martwicze plamy na liściach i obumieranie korzeni. Co do jednego, większość akwarystów wydaje się być pewna – informacja producentów jakoby preparaty antyglonowe były nieszkodliwe dla roślin wodnych nie jest zgodna z prawdą.

Nie wiemy, czy obumieranie roślin w akwariach było związane bezpośrednio z wprowadzeniem środków antyglonowych, czy może ogólną destabilizacją zbiornika (skoro dochodzi do zakwitu glonów warunki w zbiorniku nie są ustabilizowane). Wydaje się, że preparaty mają toksyczny wpływ na rośliny wodne dzięki obserwacjom etapu zwanego „startem zbiornika”. Jest to przypadek, gdy zakładane świeżo akwarium nie jest jeszcze wystarczająco „dojrzałe” pod względem zawartości metabolitów ryb, obecności odpowiedniej liczebności bakterii nitryfikacyjnych i produktów ich metabolizmu. Najczęstszym skutkiem ubocznym „świeżego zbiornika” są wykwit

glonów (szczególnie nitkowatych). W takiej sytuacji, gdy w zbiornikach stosowano preparaty antyglonowe – najczęściej obserwowano pogorszenie kondycji roślin. Natomiast gdy w świeżym zbiornikach używano „naturalnych metod zwalczania glonów”, np. poprzez wprowadzenie słodkowodnej krewetki *Caridina japonica* („krewetka Amano”) – nie obserwowano tak drastycznego pogorszenia kondycji roślin (źródło: [www.holenderskie.pl](http://www.holenderskie.pl)).

### 3. Miedź a rośliny wodne

#### 3.1 Miedź w wodach naturalnych i akwarium

W środowisku wodnym metale śladowe występują w postaci związków rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych, rozmieszczonych w wodzie, osadach i tkankach organizmów. Własności trujące metali ujawniają się, kiedy receptor przez odpowiedni okres czasu pozostaje w kontakcie z przyswajalną formą metali śladowych w stężeniu wystarczającym do wywołania niekorzystnej reakcji organizmu. Toksyczny potencjał metalu śladowego względem organizmów wodnych zależy od wielu czynników i są to m.in.: charakterystyka fizykochemiczna wody i osadów, skład i stan zdrowia populacji organizmów żywych, jak również stężenie i dostępność metalu śladowego.

Toksyczność miedzi w środowisku wodnym zależy od: zasadowości i twardości wody (jest mniej toksyczna w wodach silniej zasadowych i twardych, gdzie tworzy węglanowe kompleksy miedzi), stężenia rozpuszczonego tlenu, czynników chelatujących (m.in. kwasy organiczne), kwasów humusowych, pH oraz zawartości zawiesin stałych. Metale ciężkie w porównaniu do trucizn pochodzenia organicznego nie mogą być degradowane i kumulują się w wodzie, podłożu i organizmach żywych (Miretzky i wsp. 2004). Wiele metali, w tym miedź jest dekomponowanych w osadach dennych (zarówno w naturalnych zbiornikach jak ich modelach – akwariach). Tak związane metale są nieszkodliwe dla organizmów żywych, jednak zmiany warunków środowiskowych są w stanie zaburzyć tę równowagę i uwalniać metale do słupa wody. Mogą być wtedy obecne zarówno w wodzie jak i osadach w szerokim spektrum różnorodnych form fizykochemicznych (Fargasova et al., 1999). Czynnikiemami zewnętrznymi mającymi wpływ na osady denne są w naturze prądy wodne i fluktuacje poziomu wód w zależności od klimatu i pogody, a w akwarium – zmętnienia wody powodowane naruszeniem struktury podłoża przy czynnościach takich jak: regularne podmiany wody, czynności związane z okresowymi podmianami wody i odmulaniem dna, ryby przekopujące podłoże w poszukiwaniu pokarmu, ślimaki żerujące w podłożu (*Melanoidestuberculata*) czy filtracja denna.

Stężenie miedzi na poziomie 2-10 ppm (siarczanu miedzi) wykazały efekty mutujące na populacji bakterii *Escherichia coli*. Nie jest to bez znaczenia w przypadku

ekosystemów akwariowych, w których flora bakteryjna odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu stabilności zbiornika (cykl azotowy=amoniak->azotyny->azotany).

Zawartość metali ciężkich w środowisku wodnym wzrosła równoległe do gwałtownego procesu industrializacji przez okres ostatnich 150 lat. Wiele metali ciężkich jest mikroelementami w systemach biologicznych, ale są też bardzo toksyczne dla wodnych form życia już w stężeniach niewiele wyższych od minimalnych, wymaganych do prawidłowego wzrostu roślin. Np. miedź jest niezbędnym mikroelementem, jednak równocześnie jeśli występuje w stężeniach wyższych niż klasyfikujące ją jako mikroelement – jednym z najbardziej toksycznych metali ciężkich (Brown i Rattigan, 1979). Średnie stężenie miedzi w nieskażonych wodach rzecznych wynosi 10µg/l a w zanieczyszczonych może sięgać nawet 30-60 10µg/l (Brown i Rattigan, 1979). W zbiornikach rekreacyjnych w celu powstrzymania rozwoju szkodliwych glonów stosuje się nawet stężenie 1 mg/l i mniejsze. Miedź w połączeniu z herbicydami służy także do kontroli rozwoju różnych submersyjnych gatunków roślin naczyniowych (Brown i Rattigan, 1979). Metale ciężkie (zwłaszcza nikiel, kadm, cynk, miedź, chrom), czy herbicydy są bardziej toksyczne dla roślin wodnych niż zwierząt (Bringman i Kuhn, 1978, Blanck i wsp. 1984, Harrass i wsp. 1985, Hughes i wsp. 1988 i Lewis, 1990).

Metale ciężkie w wodzie pochodzą głównie z celowego stosowania w niej herbicydów. Identyczny proces zachodzi w akwarium – np. miedź wprowadzamy do zbiornika w wyniku kilku zabiegów: uzupełniania i podmian wody na wodę wodociągową mogącą zawierać określone stężenia miedzi, w wyniku stosowania preparatów chemicznych takich jak preparaty antyglonowe lub działające zabójczo na ślimaki zawierające szkodliwe stężenia miedzi, w wyniku stosowania nieprawidłowego nawożenia roślin w akwarium – np. poprzez stosowanie źle zbilansowanych nawozów np. jak to często ma miejsce w praktyce – stosowanie mieszanin nawozowych nie przeznaczonych do uprawy wodnej (nawozy hydroponiczne). Ponadto składniki nawozów akwarystycznych zawierają często EDTA i dodatkowo sprzyjają akumulacji metali ciężkich w tkankach roślin – w tym miedzi zawartej w preparatach antyglonowych. Często stosowana w USA technika kontrolowania zakwitów sinicowych w zbiornikach wody pitnej polegająca na dodawaniu do wody siarczanu miedzi jako algicydu pociąga za sobą gwałtowne uwolnienie toksyn do wody a przez to jej nieprzydatność do konsumpcji i rekreacji. (Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Rzeszowie: <http://bip.wios.rzeszow.pl>)

### 3.2 Pobieranie i akumulacja miedzi w roślinach wodnych

Miedź w organizmach roślinnych jest składnikiem białek i enzymów. Wchodzi w skład m.in. plastocyaniny oraz oksydazy cytochromowej (0,26%), oksydazy akorbinianowej i reduktazy azotynowej. Wraz z cynkiem występuje w dysmutazie ponadtlenkowej (SOD). W komórce znajduje się głównie w chloroplastach (Kopcewicz i Lewak, 2002).

W przypadku roślin wodnych miedź, podobnie jak i inne pierwiastki jest pobierana w formie jonowej, zarówno przez korzenie jak i części zielone (Biernacki i Lovett-doust, 1997). Miedź może być pobierana w kilku formach:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  oraz jako chelaty dostarczane wraz z nawozami lub będące naturalnymi produktami rośliny.

W roślinie pierwiastek ten jest akumulowany głównie w korzeniach a przy pobieraniu wiązany do ściany komórkowej. W przypadku roślin lądowych transport miedzi do części naziemnych ma miejsce w naczyniach ksylemu – u roślin wodnych są one najczęściej silnie zredukowane. W literaturze brak jest modeli dynamicznych określających akumulację metali w ukorzenionych wodnych roślinach naczyniowych (Jackson, 1998).

Bioakumulacja miedzi zależy od gatunku rośliny i liczby oraz fazy ontogenetycznej jej organów. Np w przypadku roślin traktowanych  $1\text{mgCu/l}$  przez 10 dni rośliny akumulowały od 95 do  $15\text{mg/kg}$  suchej masy w zależności od gatunku (Qian i wsp., 1999). Za inny przykład mogą posłużyć badania nad wątrobowcem *Scapania undulata*, który posiadając na starcie  $2,33\text{mg Cu/kg}$  pobierał miedź z zanieczyszczonego środowiska o zawartości miedzi  $31\ \mu\text{g/l}$ . Po 14 dniach stężenie miedzi osiągało w tkankach wątrobowca stężenie około  $15\text{mg/kg}$  suchej masy (Samecka-Cymerman i Kempers, 1996). Rośliny zanurzone w wodzie akumulują 2.3-4 razy więcej metali niż rośliny pływające, w szczególności gatunki łądzykowe jak *Ceratophyllum demersum* (Maleva i wsp., 2004), zapewne z racji zredukowanej kutikuli i większej powierzchni kontaktu z wodą.

Z czynników abiotycznych na jej akumulację ma wpływ głównie temperatura, pH, transport cząsteczek (prądy wody), ilość rozpuszczonych jonów miedzi w wodzie oraz interakcje pomiędzy poszczególnymi metalami.

Toksyczny efekt różnych substancji na glony i rzęsy wodne objawia się przede wszystkim zahamowaniem ich wzrostu. Jest to ogólnie rozumiany parametr a składają

się na niego pomniejsze – modyfikowane w pierwszej kolejności parametry takie jak wydzielanie tlenu czy zawartość barwników (chlorofilu, a, b i karotenoidów) (Wang i Freemark, 1995). Niezwiązana miedź jest reaktywna i tworzy wolne rodniki. Jednym z efektów toksyczności jest stres oksydacyjny wywołany akumulacją reaktywnych form tlenu (ROS) podczas różnych procesów metabolicznych (Foyer, 1997, Geoffroy i wsp. 2004).

Jego niekorzystny wpływ objawia się w znacznym spadku aktywności PSII poprzez zakłócenie transportu elektronów (rozkład wewnętrznej struktury tylakoidu po donorowej stronie PSII). Objawami destrukcyjnego działania miedzi jest spadek wydzielania tlenu fotosyntetycznego (poparte licznymi doświadczeniami z *Elodea canadensis*). Dochodzi do tego w wyniku uszkodzenia błon tylakoidowych poprzez peroksydację lipidów – (pod wpływem jonów miedzi peroksydacji ulegają też np. lipidy w surowicy człowieka), bądź ich hydrolizy i uwalniania kwasów tłuszczowych, a wolne kwasy tłuszczowe hamują aktywność PSII (Kopcewicz i Lewak, 2002). Jony miedzi reagują też z grupami SH białek błonowych zmieniając ich właściwości.

Wielu badaczy wykazało negatywny wpływ miedzi na ogólną zawartość chlorofilu w liściach *L. minor* (Teisseire i wsp., 1998,99). U *L. minor* poddanej działaniu siarczanu miedzi – całkowita zawartość chlorofilu spadła od 4 do 11% poniżej kontroli. Dla porównania - pod wpływem diuronu zawartość chlorofilu wzrosła o 25-39% w porównaniu do kontroli. Diuron jest zbliżony pochodzeniem do munuronu, ma podobny wpływ na asymilację fosforanów i amoniaku, lecz prawie 20-krotnie słabiej działa na asymilację węgla (Brown i Lean, 1995). Ta sama roślina traktowana mieszaniną siarczanu miedzi i diuronu posiadała większą zawartość chlorofilu w stosunku do kontroli, którą to własność należy przypisać pestycydowi. Mimo dużej toksyczności samej miedzi -w połączeniu z diuronem nie powodowała żadnych chloroz i ogólna zawartość chlorofilu była wyższa niż w przypadku kontroli (Teisseire i wsp., 1998). Mimo niekorzystnego działania miedzi poprzez produkcję ROS i degradację błon i barwników fotosyntetycznych w badanych roślinach nie miało to miejsca. Teisseire i wsp. Wyszuli hipotezę jakoby diuron spełniał rolę protektora przed stresem oksydacyjnym (ROS) wywołany przez toksyczne jony miedzi. Przypuszczenia oparto na znanym działaniu diuronu objawiającym się produkcją nietypowych chloroplastów charakteryzujących się szerszymi granami i wyższym poziomem upakowania tylakoidów – co sprawia, że takie chloroplasty są mniej wydajne w konwersji światła w porównaniu do zdrowych chloroplastów (Teisseire i wsp., 1998). Diuron pomimo

silnego hamowania wzrostu (>90%) sprawiał, że po 7 dniach ekspozycji na ten czynnik, zawartość chlorofilu była większa niż w kontroli. Warto mieć na uwadze, że nie spotyka się wśród preparatów akwarystycznych mieszanek miedzi z pestycydami. Jednak badania przeprowadzone 2 lata później dowiodły, że diuron bardzo słabo indukuje enzymatyczne szlaki antyoksydacyjne u *L. minor* i jego działanie ochronne w przypadku ogólnej zawartości chlorofilu nie jest związane z obroną antyoksydacyjną enzymów takich jak peroksydaza askorbinianowa, czy reduktaza glutationowa (Teisseire i Vernet, 2000).

### **3.3 Mechanizmy odpornościowe na miedź**

Nie poznano dotąd szczegółowo mechanizmów odpornościowych roślin wodnych na metale ciężkie. Istnieją przypuszczenia, że z racji pochodzenia roślin wodnych (są to rośliny lądowe, które wtórnie opanowały środowisko wodne) posiadają one identyczne mechanizmy odpornościowe jak ich lądowi krewni. Pewne jest, że przekształceniom uległ charakter niektórych reakcji, ale ogólny sens procesu pozostał zapewne niezmienny, szczególnie z racji konserwatywności wielu enzymów i kodujących je genów biorących udział w procesach odporności na metale..

Miedź w ilości szkodliwej jest czynnikiem stresowym prowadzącym do szeregu zmian w funkcjonalności metabolicznej i transportowej komórek. Jak w przypadku każdego czynnika stresogenego, tak i w przypadku miedzi dochodzi do wytworzenia mechanizmów adaptacyjnych w zależności od czasu trwania i nasilenie tego czynnika.

Opisuje się dwa rodzaje podstawowych mechanizmów adaptacyjnych. Jeden z nich to unikanie, polegający na tworzeniu fizycznych lub chemicznych barier, które zmniejszają dostęp czynnika stresowego do komórek i prawdopodobieństwo wywołania uszkodzeń. W przypadku niskiej skuteczności strategii unikania, rośliny indukują mechanizmy wewnątrzkomórkowe określane mianem strategii tolerancji, których celem jest dezaktywacja metalu wewnątrz protoplastu i naprawa niekorzystnych skutków czynnika stresogenego.

Jednym z procesów zewnątrzkomórkowych jest podobnie jak w przypadku roślin lądowych – modyfikacja ryzosfery. Zjawisko to występuje w przypadku roślin ukorzenionych w podłożu. Rośliny na drodze dyfuzji wydzielają do ryzosfery tlen, który stwarza wokół korzeni strefę utleniającą (Wójcik, 1995). Dzięki temu np. łatwiej rozpuszczalne metale ciężkie utleniają się dając mniej toksyczne, nierozpuszczalne

formy. W przypadku roślin lądowych znane jest zjawisko akumulacji jonu żelazowego w strefie przykorzeniowej. Związki żelaza takie jak np. wodorotlenki posiadają właściwości kompleksujące m.in. jonów miedzi – nie wiemy czy proces ten ma duże znaczenie w środowisku wodnym

Możliwość unikania stresu istnieje również dzięki detoksyfikacji jonów metali w środowisku na skutek wydzielania przez rośliny związków kompleksujących metale. Chelatowanie metali w środowisku zewnętrznym, znacznie redukuje ich toksyczność i ogranicza pobieranie przez rośliny. Natura chelatorów w wielu przypadkach nie jest dobrze poznana. Mogą to być polipeptydy, jak u sinicy *Anabaena cylindrica*, lub silnie kompleksujące metale kwasy hydroksamowe wydzielane przez *Anabaena flos-aquae*, a wykryte w próbkach wody morskiej podczas zakwitów tych gatunków (Wójcik i Tukendorf 1995, Hall 2002). Kwasy hydroksamowe, wydzielane przez sinice i pełniące w nich funkcje sideroforów aktywnych w transporcie żelaza, mogą więc dodatkowo detoksyfikować nadmiar miedzi w środowisku. Wytwarzanie i wydzielanie na zewnątrz substancji chelatujących nie odbywa się stale, lecz tylko w odpowiedzi na obecność jonów metali w środowisku wzrostu. Zaobserwowano taką zależność u okrzemki *Nitzschia closterium*, która wytwarza eksudat kompleksujący jedynie w obecności jonów miedzi w środowisku, a jego ilość rośnie wraz ze wzrostem stężenia (Wójcik i Tukendorf 1995, Hall 2002).

Innym zewnątrzkomórkowym procesem ograniczającym dostęp miedzi do symplastu jest mobilizacja jonów miedzi w ścianie komórkowej (może zatrzymywać 80-95% metali pobieranych przez komórkę), w której metale są komponowane w przestrzeniach wodnych między micelami celulozy. Ponadto silne właściwości wiążące metale są charakterystyczne dla grup karboksylowych kwasów pektynowych (Wójcik i Tukendorf 1995, Hall 2002).

Kolejnym procesem z pogranicza czynników wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych jest wydzielanie jonów miedzi poza obszar komórki, częściej spotykany u glonów niż u hydrofitów (u nich jony miedzi gromadzą się w obumierających częściach). Makrofity są w stanie uwalniać miedź do wody – szczególnie jeśli umieszczane są w roztworze czystej wody destylowanej, stąd praktyka umieszczania hydrofitów na 24 godziny w naczyniach z wodą destylowaną przed założeniem doświadczeń na obecność miedzi.

Komórki roślinne wyposażone są w efektywny system antyoksydacyjny chroniący przed skutkami nadmiaru reaktywnych form tlenu. Mechanizmy



wewnątrzkomórkowe obejmują szereg enzymów takich jak katalazy, peroksydazę askorbinianową i reduktazę glutationową (Geoffroy i wsp. 2002). Ponadto komórki roślinne produkują metalotioneiny będące specyficznymi detoksykantami metali ciężkich w komórce.

Zachodząca w obecności metalu indukcja biosyntezy fitochelatyn (bez udziału rybosomów) ma miejsce u wszystkich roślin autotroficznych (Williams i wsp., 2000). Dzięki nim rośliny są w stanie tworzyć w wakuoli kompleksy z metalami i w ten sposób zwiększać swoją tolerancję na ich toksyczne dawki.

Kwasy organiczne i aminokwasy takie jak kwas cytrynowy, jabłkowy, histydyna mogą pełnić rolę ligandów metali ciężkich i w ten sposób brać udział w procesie detoksykacji. Ponadto według Campbella (1998) miedź często wiąże się z różnymi organicznymi ligandami stając się przez to mniej dostępną dla ukorzenionych makrofitów. Hipoteza ta nie została przetestowana eksperymentalnie, chociaż potwierdza ją praktyka akwarystyczna. Działanie kwasów organicznych w szerszym znaczeniu i przykłady zostało przytoczone przy opisie preparatu: Tetra Algumin<sup>®</sup>.

#### **4. Cel pracy**

Praca ta ma na celu sprawdzenie hipotezy związanej z toksycznością preparatów antyglonowych na rośliny wodne. Producenci tych środków informują, że nie są one szkodliwe dla roślin akwariowych, czego nie potwierdza długoletnia praktyka akwarystyczna. Celem eksperymentów przeprowadzanych na potrzeby tej pracy jest wykazanie charakteru wpływu antyglonów na morfologię i aspekty fizjologiczne wybranych grup roślin wodnych

Z racji ograniczonej liczebności materiału do badań, ograniczono się do wyselekcjonowania najciekawszych środków spośród dostępnych na rynku. Wybór padł na produkt naszego rodzimego producenta oparty na siarczanie miedziowym –Tropical Algin<sup>®</sup> oraz niezwykle skuteczny preparat o składzie objętym tajemnicą producenta - ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup>.

Dla wykazania ewentualnego wpływu środków antyglonowych na wodne rośliny wyższe, zastosowano przyżyciowe metody pomiaru parametrów fotosyntezy umożliwiające śledzenie zmian w kondycji rośliny bez uszkodzania jej tkanek.

## II. Materiały i metody

### 1. Warunki hodowli i materiał roślinny

W pracy wykorzystano trzy grupy roślin: glony, błotne rośliny ukorzenione oraz makrofity pływające po powierzchni wody.

Wybór gatunku glonu zależał od jego dostępności, wymagań i łatwości użycia. Przedstawiciele grupy glonów stanowiła mieszanina 2 gatunków jednokomórkowej, kolonialnej zielenicy z rodzaju *Pediastrum* –: *P. boryanum* i *P. integrum*.

Rośliny ukorzenione reprezentowane były przez dwa gatunki z rodzaju *Echinodorus*: *E. longiscapus* (Arech) i *E. pellucidus* (Rataj) uprawiane w warunkach submersyjnych.

Hydrofity pływające: *Lemna minor* i *Limnobium laevigatum* ((Willd.) Heine). Wszystkie rośliny użyte w doświadczeniach zostały pobrane z basenów szklarniowych Wrocławskiego Ogrodu Botanicznego, gdzie były uprawiane w jednakowych warunkach hodowlanych. Przed przygotowaniem doświadczeń wszystkie rośliny poddane zostały 3-dniowej aklimatyzacji do warunków pokoju hodowlanego i środowiska pożywek.

Naczynia z badanymi roślinami zostały umieszczone w pokoju hodowlanym w temp. 25°C przy świetle fluorescencyjnym o cyklu świetlnym 16/8 przy kombinacji lamp zbliżonych do tych stosowanych w akwarystyce (Osram Fluora<sup>®</sup>, Philips Aquarelle<sup>®</sup>, Philips TLD<sup>®</sup> oraz Osram Daylight<sup>®</sup>).

### 2. Metodyka pomiarów

Glony *Pediastrum* zbadano pod kątem zawartości barwników fotosyntetycznych: chlorofilu a, b, i karotenoidów

W przypadku rzęsy (*L. minor*) jako metodę różnicującą wpływ preparatów, wykorzystano pomiar biomasy, wzbogacony o dokumentację zdjęciową.

Wpływ antyglonów na *E. longiscapus*, *E. pellucidus* i *L. laevigatum* określono metodami: pomiaru fluorescencji chlorofilu (mierząc potencjalną i aktualną wydajność kwantową PSII) oraz wymiany gazowej (określająca fotosyntezę netto).

Ponadto w przypadku *L. laevigatum* określono zawartość miedzi w pożywkach, korzeniach i liściach roślin w celu oszacowania wpływu preparatu miedziowego (Tropical Algin<sup>®</sup>) na wegetację tej rośliny. Zważono także suchą masę korzeni i zielonych części roślin oraz wykonano dokumentację zdjęciową ukazującą charakterystyczny wpływ na morfologię roślin.

Wszystkie preparaty antyglonowe zostały poddane analizie na zawartość miedzi metodą spektroskopii atomowej na aparacie Perkin Elmer<sup>®</sup> 3300.

## 2.1 Analiza stężenia chlorofilu w glonach

Do kolb Erlenmayera na 200 ml z wysterylizowaną wcześniej pożywką „medium „Z-„ – Zehnder in Staub (1961) wprowadzono jałowo identyczną objętość glonów *Pediastrum*. Skład pożywki był następujący: (w mg/l): NaNO<sub>3</sub> 467; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 59; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 31; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 25; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 21. Do pożywki dodano 10ml roztworu podstawowego Fe-EDTA (0,1M FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O w 0,1M HCl+Na<sub>2</sub>-EDTA) i następujące mikroelementy (mg/100ml): H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 310; MnSO<sub>4</sub>\*4H<sub>2</sub>O 223; Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 3,3; (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub>\*4H<sub>2</sub>O 8,8; KBr 11,9; KI 8,3; ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 28,7; Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 15,4; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 14,6; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 12,5; NiSO<sub>4</sub> 19,8; (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>\*6H<sub>2</sub>O 19,8; CrNO<sub>3</sub>\*16H<sub>2</sub>O 3,7; V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>\*16H<sub>2</sub>O 3,5; Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 47,4; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>\*24H<sub>2</sub>O 47,4. pH ustalono na 6,4.

W celu określenia spektrum wpływu preparatów na glony, środki zostały wprowadzone w 3 stężeniach, dla których wykonano po 3 powtórzenia oraz przygotowano 5 prób kontrolnych z samą pożywką:

- 1x (dawka według instrukcji producenta)
- 2x (podwójna dawka zalecana do akwarium)
- 10x (dawka 10-krotne większa niż proponowana w instrukcji)

Następnie pozostawiono glony w pokoju hodowlanym na okres 21 dni w celu ich namnożenia, okresowo wytrząsając kolby. Po tym czasie z każdej kolby pobrano po

5ml zawiesiny glonów które poddano wirowaniu przez 10 min. przy 15000 obrotów w temperaturze 4°C. Tak otrzymany supernatant został odlany a powstały osad glonowy został poddany procesowi ekstrakcji chlorofilu w obecności 80% acetonu w szklanych poterkach używanych do maceracji RNA. Każda próba ucierana była przez 1 minutę w 1ml 80% acetonu.. Zawiesinę subkomórkową glonów w 80% acetonie poddano następnie wirowaniu przez 10min. w 4°C przy 10000 obrotów po czym w otrzymanym supernatancie zmierzono absorbancję na spektrofotometrze SPEKOL<sup>®</sup> przy długościach fali: 663nm, 646nm i 470nm

W celu wyliczenia zawartości chlorofu a, b i karotenoidów oraz ogólnego chlorofilu w glonach *Pediastrum* skorzystano z poniższych wzorów podanych w skrypcie „Ćwiczenia z Fizjologii Roślin” pod redakcją J. Buczka. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 1992.

$$C_a = 12,25_{A663} - 2,79_{A646}$$

$$C_{a+b} = 7,15_{A663} + 18,71_{A664}$$

$$C_b = 21,5_{A646} - 5,1_{A663}$$

$$C_{x+c} = 1000_{A470} - 1,82C_a - 85,02C_b$$

-----  
168

## 2.2 Pomiar plonowania *Lemna minor*

W przypadku *Lemna minor* zastosowano identyczne dawki preparatów i taką samą liczbę powtórzeń jak dla *Pediastrum*. Pożywkę stanowiła trzykrotnie rozcieńczona pożywka Hoaglanda Skład pożywki pełnej: (g/l): Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1,18; KNO<sub>3</sub>, 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,14; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,25. Do pożywki dodano 1ml roztworu mikroelementów o składzie (mg/l): cytrynian żelaza, 19730; MnSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 2410; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 310; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 250; ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 3; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 2.

Do eksperymentu użyto dojrzałych 2-4 listnych egzemplarzy tak by docelowa ilość liści w każdej próbie wynosiła +/- 50 listków w każdym powtórzeniu. Rośliny umieszczono w kolbach Erlenmayera na 200ml.

Po 14 dniach inkubacji zważono biomasę *L. minor*.

### 2.3 Pomiar parametrów fotosyntetycznych

Po 3 dniowej adaptacji do nowych warunków (temperatura, natężenie światła, pożywka,) rośliny *E. pellucidus* zostały umieszczone na jednakowej wysokości w 2l cylindrach z 10% pożywką Hoaglanda (skład jak w przypadku *L. minor*) zawierającą stężenie preparatów antyglonowych w dawkach podanych w instrukcji stosowania danego preparatu. Całość miała zatem symulować sytuację w akwarium po podaniu preparatu antyglonowego. W przypadku *E. pellucidus* podmieniano pożywkę po wykonaniu pierwszej fazy pomiarów parametrów fotosyntetycznych a więc po 7 dniach doświadczenia. Wymiana pożywki na świeżą dodatkowo symulować miała cotygodniową podmianę wody (zabieg stosowany w akwarystyce), po której następowało podanie kolejnej dawki preparatu antyglonowego. Przez cały czas trwania doświadczenia pożywki były intensywnie napowietrzane. Oprócz 4 kontroli przygotowano po 3 powtórzenia dla obu preparatów, które zostały wprowadzone w stężeniu odpowiadającym dawkowaniu z instrukcji stosowania preparatów.

Pomiary fluorescencji wykonywano *in vivo* na fluorymetrze FMS2 Hansatech®. W roślinach adaptowanych przed pomiarem w ciemności aparat, dzięki działaniu małego lub dużego natężenia modulowanego światła, wyznacza dwa podstawowe parametry fluorescencji: minimalną ( $F_0$ ) oraz maksymalną ( $F_m$ ) na podstawie których wylicza pozostałe parametry takie jak: np. fluorescencja zmienna ( $F_v = F_m - F_0$ ). Pomiary tej fluorescencji umożliwiają wyznaczenie potencjalnej sprawności fotosystemu II ( $F_v/F_m$ ) W roślinach bez adaptacji w ciemności aparat odczytuje odpowiednio dla  $F_0$  wartość  $F_s$  a dla  $F_m$  wartość  $F_m'$  i wylicza aktualną sprawność fotosystemu II ( $\Phi_{PSII}$ )

Pomiar asymilacji gazowej w procesie fotosyntezy wykonano *in vivo* na aparacie CIRAS®. Za jego pomocą zmierzono fotosyntezę netto ( $P_n$ ) – parametr wyliczany na podstawie analizy stężenia  $CO_2$  i pary wodnej w powietrzu w odniesieniu do zawartości gazów wydzielanych przez liście (mierzonej na podstawie pomiaru absorpcji promieniowania podczerwonego). Jednostką  $P_n$  są  $\mu$ mole zasymilowanego  $CO_2$  na metr kwadratowy na sekundę.

Pomiar parametrów fotosyntetycznych został przeprowadzony także dla *L. laevigatum*, w przypadku której przygotowano 5 kontrol i 5 powtórzeń dla każdego z preparatów. Na każde powtórzenie składało się po 5 roślin o zbliżonej masie i ilości liści. Pozostałe warunki doświadczenia były identyczne jak w przypadku *E. pellucidus*.

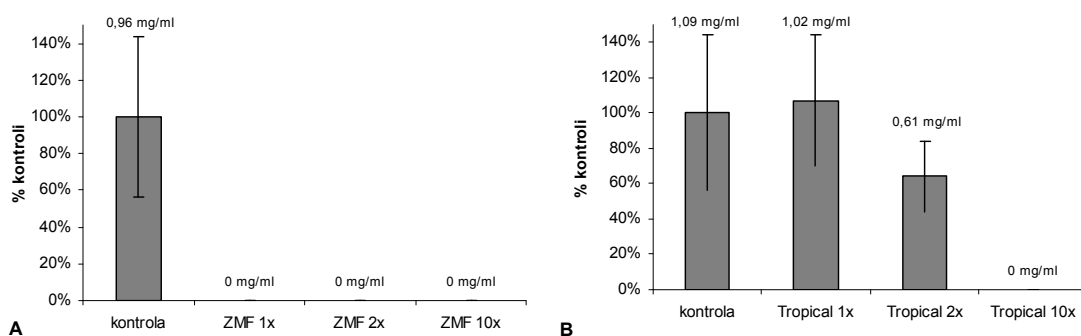
## 2.4 Analiza zawartości miedzi

Oprócz pomiaru parametrów fotosyntezy, *L. laevigatum* wraz z pożywkami zostało poddane analizie na zawartość miedzi. Korzenie i liście wysuszono, zważono suchą masę każdej próby a następnie pobrano po 300mg (dla liści) i 100mg (dla korzeni) i zalano 5ml 60% kwasu azotowego i przeprowadzono ich mineralizację w piecu mikrofalowym (system MDS 2000). Spalone próby zostały ilościowo przeniesione do szklanych cylindrów i uzupełnione wodą destylowaną do objętości 10ml. Obecność metalu oznaczono metodą absorpcji atomowej na aparacie Perkin Elmer® 3300.

### III. Wyniki

#### 1. Wpływ preparatów antyglonowych na wzrost glonów *Pediastrum*

Glony wykazały dużą wrażliwość na preparat ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup>, który powodował degradację chlorofilu już przy stężeniu jednokrotnym – zalecanym do stosowania w akwarium (wykres 1a). Glony traktowane Tropical Algin<sup>®</sup> również w dawce zalecanej w instrukcji, nie wykazywały istotnej różnicy w zawartości chlorofilu a i b w stosunku do kontroli. Dopiero jego dwukrotnie większe stężenie redukowało barwniki o 36% a dziesięciokrotne stężenie preparatu powodowało już całkowite zniszczenie barwników fotosyntetycznych u *Pediastrum* (wykres 1b).



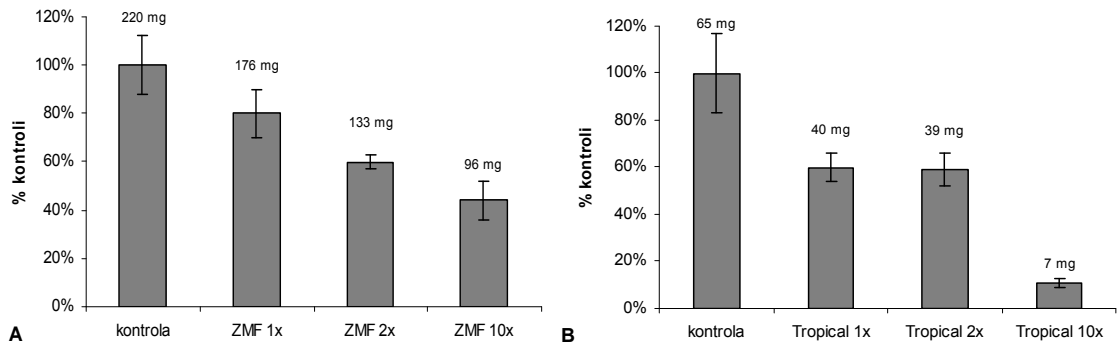
Wykres 1. Wpływ preparatu ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> (a) oraz Tropical Algin<sup>®</sup> (b) na zawartość chlorofilu a i b w komórkach glonów rodzaju *Pediastrum*. Pomiary po 21 dniach działania środka. 1x – dawka o stężeniu zalecanym do akwarium, 2x – podwójna dawka, 10x – dawka dziesięciokrotnie wyższa. Wyniki podano jako procent kontroli.

#### 2. Wpływ preparatów na plonowanie *Lemna minor*

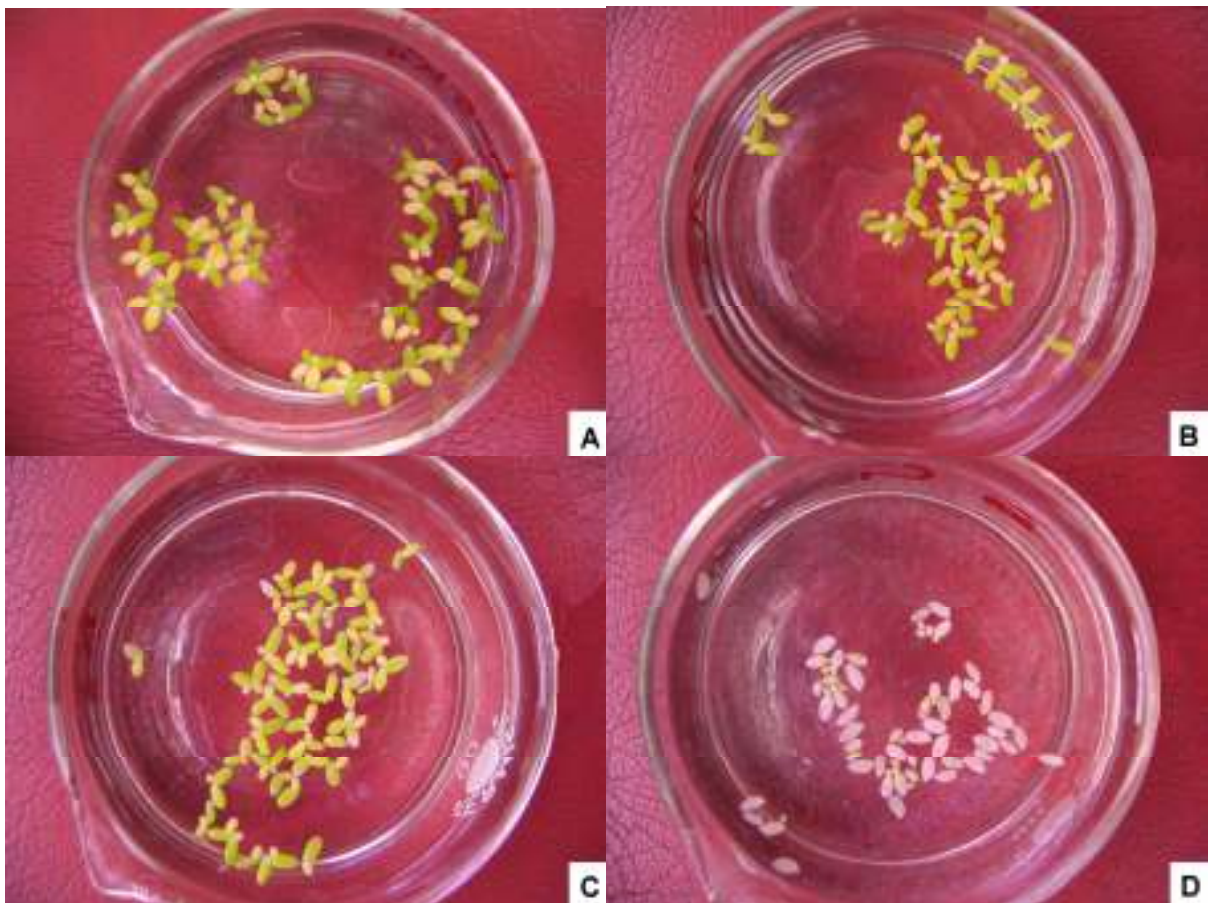
*Lemna minor* po 14 dniowym traktowaniu ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup>, w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium, reagowała redukcją biomasy o 20%. Dwukrotnie wyższe stężenie powodowało redukcję biomasy o 40% a 10-krotne redukowało masę rzęsy do 56% w porównaniu do kontroli (wykres 2a). Zauważono bardzo szybką utratę korzeni już po kilku dniach po założeniu eksperymentu.

W przypadku preparatu Tropical Algin<sup>®</sup> obserwowano redukcję świeżej masy do 60% - zarówno dla dawki zalecanej do akwarium, jak i dwukrotnie wyższej (wykres

2b). Ponadto obserwowano chlorozy, głównie w starszych liściach (Fot.1b,c). Dawka 10-krotnie wyższa powodowała silną redukcję biomasy (o 89%) oraz niemal całkowitą chlorozę starszych i częściowo młodych liści (fot.1d)



Wykres 2. Wpływ preparatu ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> (a) oraz Tropical Algin<sup>®</sup> (b) na świeżą masę *Lemna minor* po 14 dniach działania środka. 1x – dawka o stężeniu zalecanym do akwarium, 2x – podwójna dawka, 10x – dawka dziesięciokrotnie wyższa. Wyniki podano jako procent kontroli.



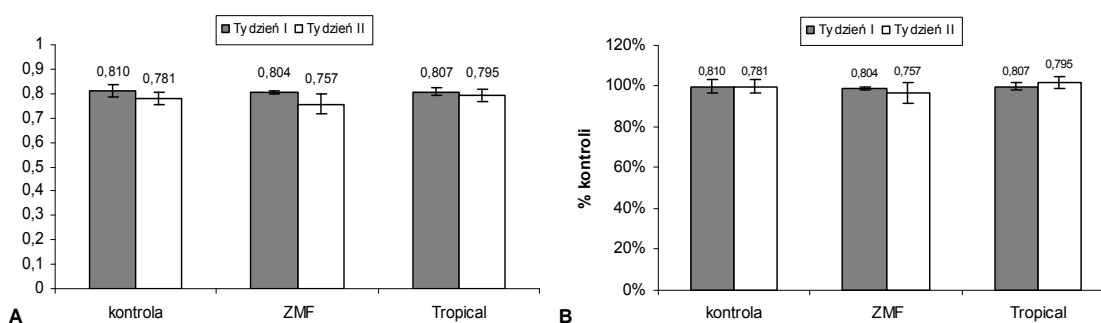
Fot. 1 Wpływ preparatu Tropical Algin<sup>®</sup> na morfologię *L. minor*. A – próba kontrolna, B – preparat Tropical Algin<sup>®</sup> w stężeniu zalecanym w instrukcji, C – środek w stężeniu dwukrotnie wyższym, D – 10-krotnie wyższe stężenie preparatu.



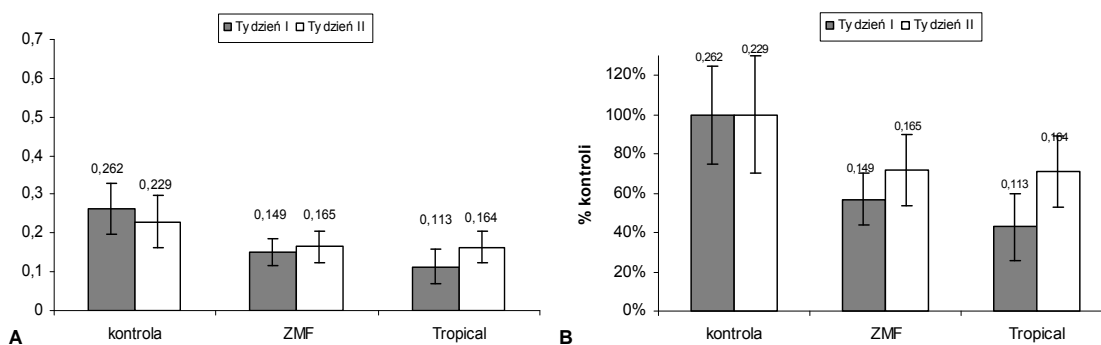
### 3. Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną *E. pellucidus*

W przypadku *Echinodorus pellucidus*, potencjalna wydajności PSII była stabilna w przypadku obu preparatów i nie odbiegała znacząco od wartości kontrolnych, zarówno po 7 jak i 14 dniach doświadczenia (wykres 3a, b).

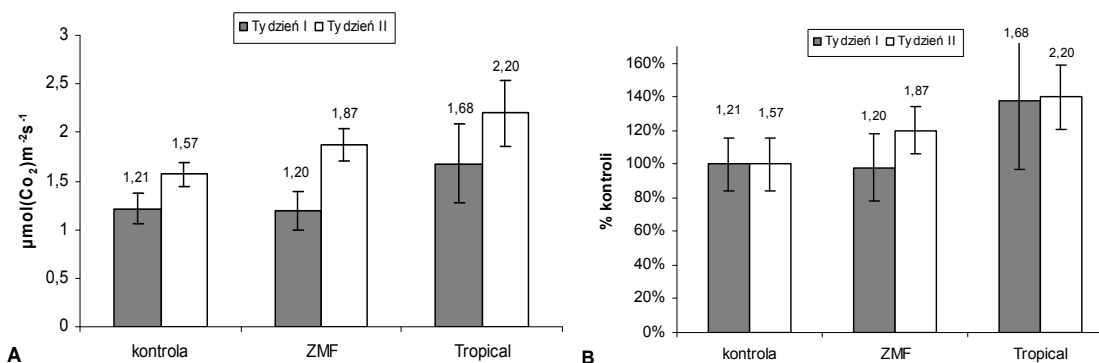
Pomiary aktualnej wydajności PSII wykazały po 7 dniach spadek tego parametru przy obu preparatach niemal o 50% w stosunku do kontroli. Po 14 dniach wartości te były niższe od kontrolnych o ok. 25% (wykres 4b). Traktowanie roślin ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> przez 7 dni, nie zmieniało w stosunku do kontroli wydajności fotosyntezy netto do kontroli. Po 14 dniach wartość fotosyntezy netto była o 20% wyższa niż kontrolna (wykres 5a, b). W przypadku wpływu preparatu Tropical Algin<sup>®</sup> na fotosyntezę netto, zarówno w pierwszym jak i drugim tygodniu traktowania, parametry były lepsze o ok. 40% od wyników kontrolnych (wykres 5a, b).



Wykres 3. Potencjalna wydajność PSII (Fv/Fm) u *Echinodorus pellucidus* po I i II tygodniu traktowania preparatem ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>. Preparaty podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach bezwzględnych, wykres b w procentach kontroli.



Wykres 4. Aktualna wydajność PSII ( $\phi$ PSII) u *Echinodorus pellucidus* po I i II tygodniu traktowania preparatem ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>. Preparaty podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach bezwzględnych, wykres b w procentach kontroli.



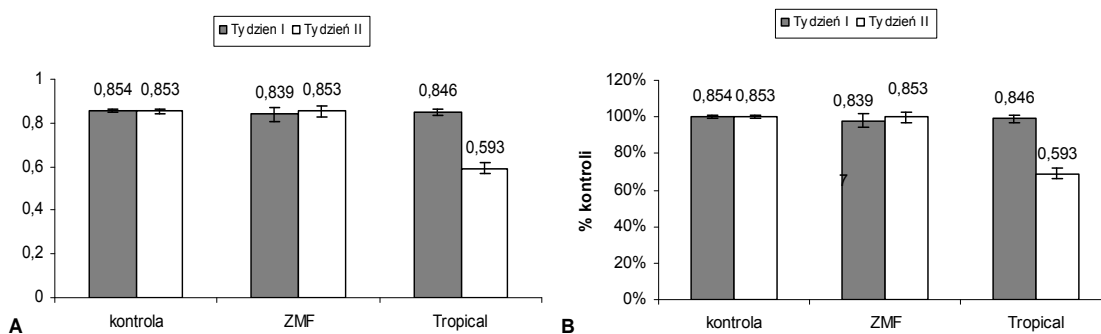
Wykres 5. Wykres pomiaru wydajności fotosyntezy netto u *Echinodorus pellucidus* po I i II tygodniu traktowania preparatem ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>. Preparaty podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach względnych, wykres b w procentach kontroli.

#### 4. Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną *L. laevigatum*

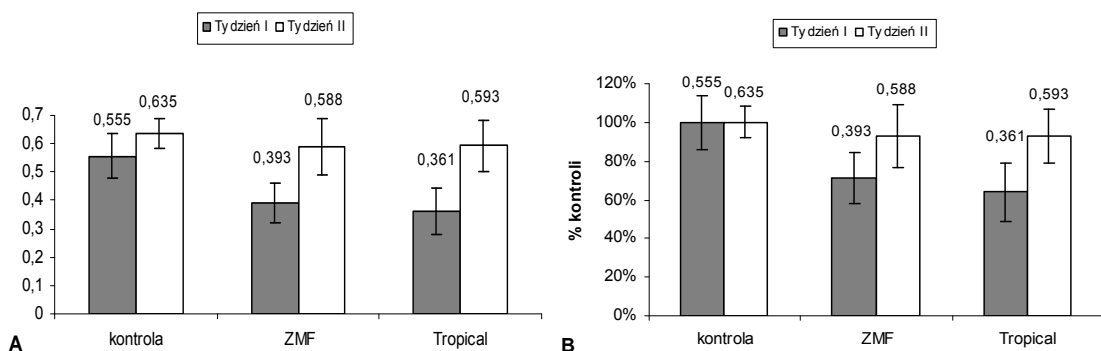
*Limnium laevigatum* wykazało spadek potencjalnej wydajności PSII po 2 tygodniu traktowania roztworem Tropical Algin<sup>®</sup>, w odniesieniu do wyników kontroli (wykres 6: a, b). ZMF nie miał wpływu na ten parametr.

Aktualna wydajność PSII po 7 dniach traktowania była niższa niż w kontroli o 29% w przypadku preparatu ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz o 36% dla Tropical Algin<sup>®</sup>. Po 14 dniach traktowania aktualna wydajność PSII w przypadku obu preparatów była niższa jedynie o 7% w stosunku do kontroli (wykres 7b).

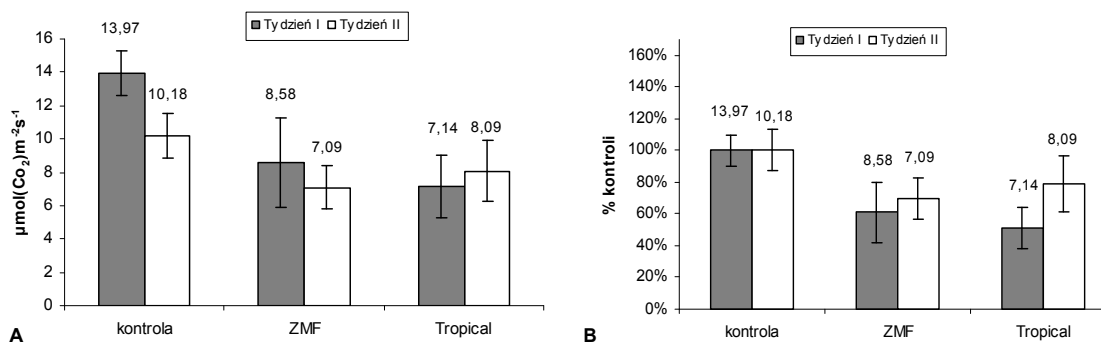
Pomiary wydajności fotosyntezy netto wykazały dla ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> znaczny spadek wartości parametru w stosunku do kontroli (o 39% po pierwszym tygodniu, po drugim parametr ten był niższy o 30% w stosunku do kontroli). Tropical Algin<sup>®</sup> powodował jeszcze większy spadek wydajności aktualnej PSII – był on niższy od kontrolnego o 49% po pierwszym tygodniu i o 21% po drugim tygodniu stosowania preparatu (wykres 8b).



Wykres 6. Potencjalna wydajność PSII (Fv/Fm) u *Limnobiium laevigatum* -po I i II tygodniu traktowania preparatem ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>. Preparaty podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach bezwzględnych, wykres b w procentach kontroli.



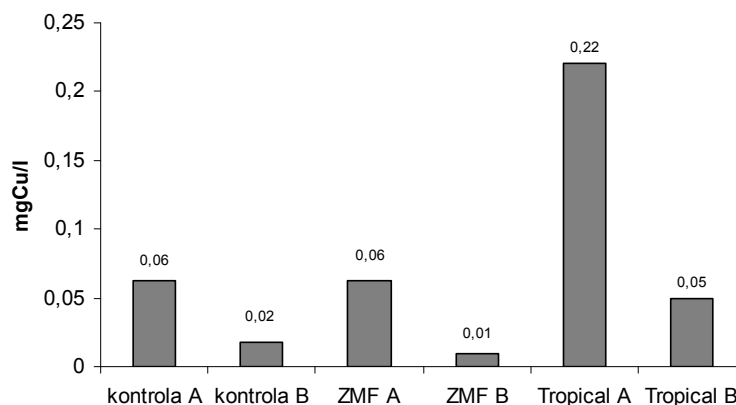
Wykres 7. Aktualna wydajność PSII ( $\phi$ PSII) u *Limnobiium laevigatum* po I i II tygodniu traktowania preparatem ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>. Preparaty podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach bezwzględnych, wykres b w procentach kontroli.



Wykres 8. Wykres pomiaru wydajności fotosyntezy netto u *Limnobiium laevigatum* po I i II tygodniu traktowania preparatem ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>. Preparaty podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach względnych, wykres b w procentach kontroli.

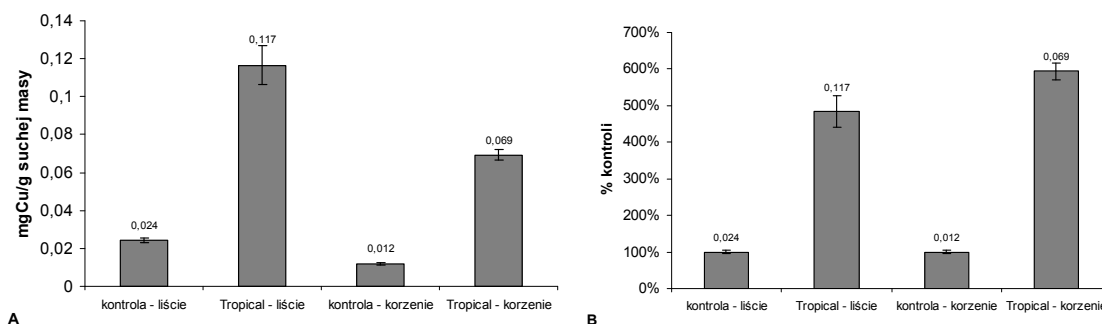
## 5. Wpływ preparatów na wzrost i zawartość miedzi u *L. laevigatum*

Na zakończenie doświadczenia po 14 dniach, (przy jednej podmianie pożywki z nową dawką Cu po 7 dniach hodowli) w kombinacji kontrolnej oznaczono 0,02 mgCu/l, w kombinacji z preparatem ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> - 0,01mgCu/l a ze środkiem Tropical Algin<sup>®</sup> - 0,05 mgCu/l (wykres 10).

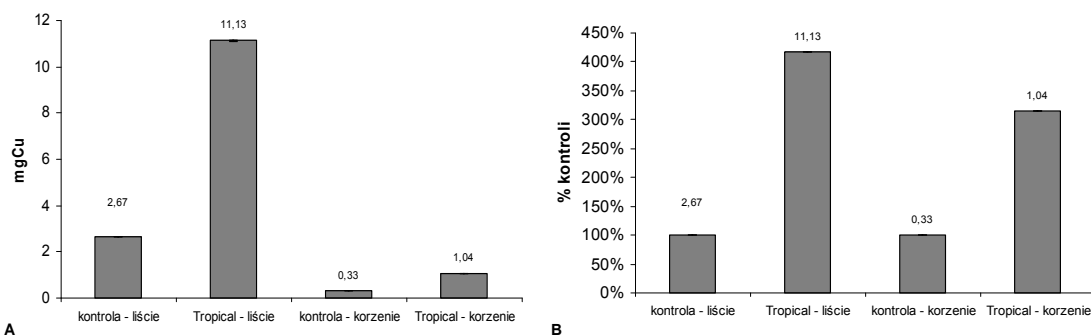


Wykres 9. Zawartość miedzi w pożywce traktowanej preparatami antyglonowymi na początku i po okresie 14 dni doświadczenia. A – zawartość miedzi w pożywce na początku doświadczenia. B – zawartość miedzi w pożywce po 14 dniach. Preparat Tropical został dostarczony w dawce zalecanej do stosowania w akwarium. W przypadku kontroli i preparatu ZMF obecność miedzi wynika ze składu mikroelementowego pożywki.

Przeprowadzono testy z wpływem preparatu miedziowego (Tropical Algin<sup>®</sup>) po 14 dniach działania, które wykazały różnice w stosunku do roślin kontrolnych - niemal pięciokrotnie wyższą zawartość miedzi na gram suchej masy w liściach roślin traktowanych tym środkiem, oraz niemal 6-krotnie większą zawartość miedzi w korzeniach (wykres 10a, b). W przeliczeniu na jedną roślinę wartość miedzi w korzeniach przekraczała trzykrotnie wartości kontrolne a w liściach aż czterokrotnie.

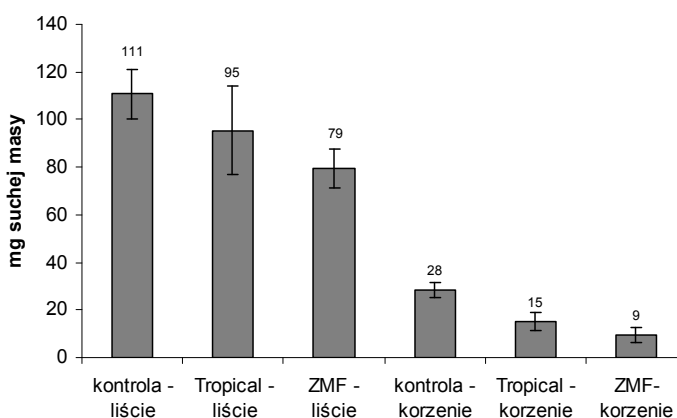


Wykres 10. Zawartość miedzi na gram suchej masy *Limnobium laevigatum* po 2 tyg. traktowania preparatem Tropical Algin<sup>®</sup>. Preparat podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach względnych, wykres b w procentach kontroli. Po 7 dniach doświadczenia pożywki wraz z odpowiednimi dawkami preparatów były podmieniane na świeże.

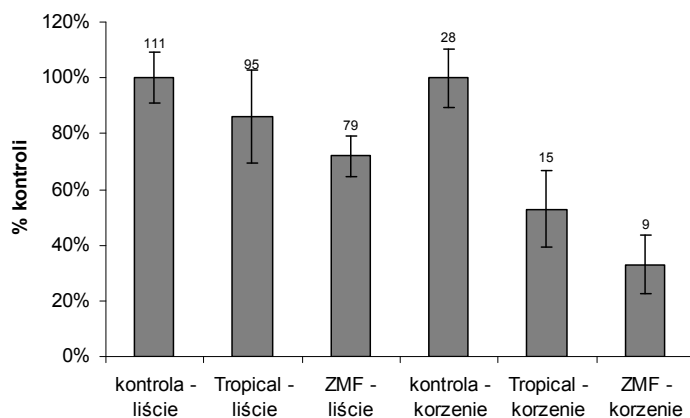


Wykres 11. Zawartość miedzi (mgCu) w *Limnobium laevigatum* traktowanym preparatem Tropical Algin<sup>®</sup> w przeliczeniu na 1 roślinę. Preparat podano w stężeniu zalecanym do stosowania w akwarium. Wykres a przedstawia dane w wartościach względnych, wykres b w procentach kontroli. Po 7 dniach doświadczenia pożywki wraz z odpowiednimi dawkami preparatów były podmieniane na świeże.

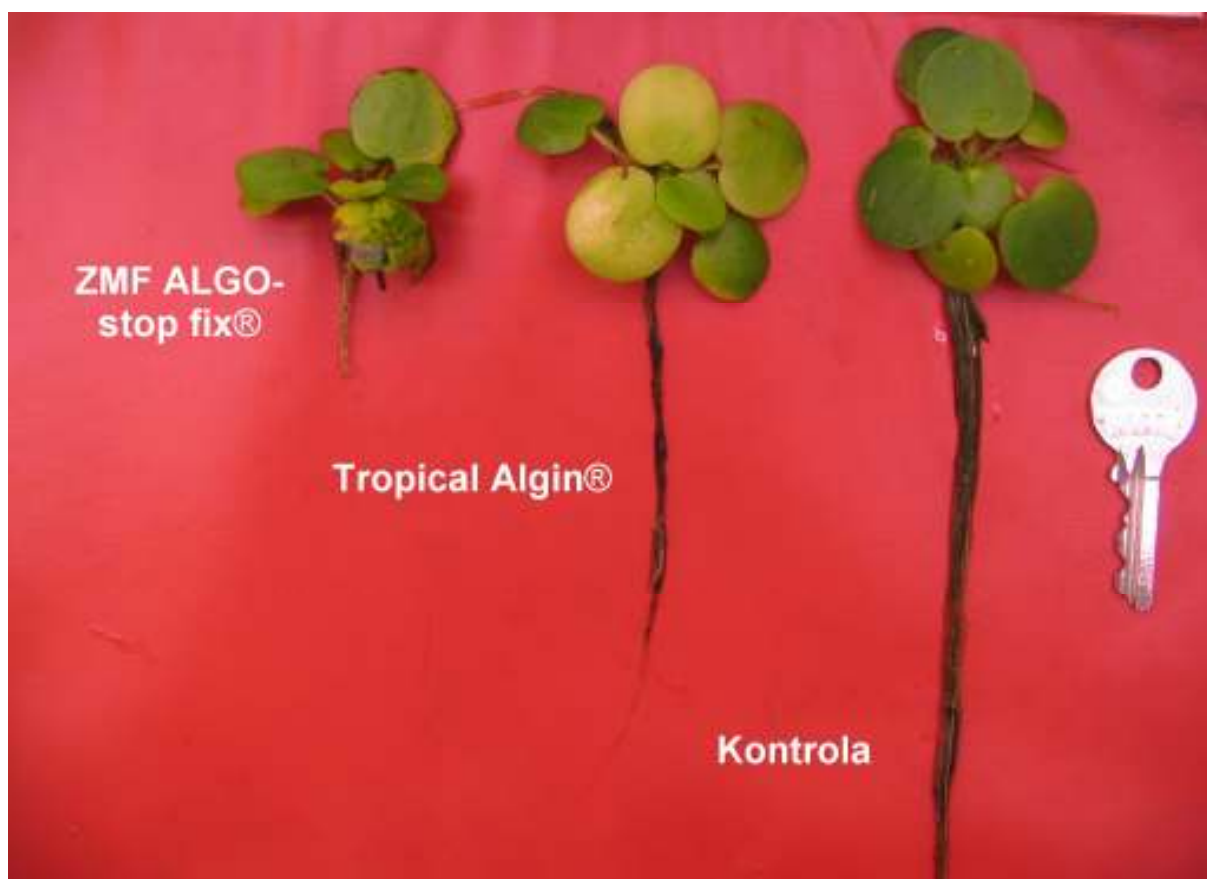
W przypadku obu preparatów zauważono niekorzystny wpływ na wartość suchej masy liści i korzeni *L. laevigatum* po 14 dniach traktowania antyglonami. Tropical Algin<sup>®</sup> powodował redukcję suchej masy liści o 14% a korzeni o 47%. ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> redukował suchą masę o 28% w przypadku liści oraz aż o 67% w przypadku korzeni badanych roślin (wykres 13, fot. 2). Bardziej wrażliwe na preparaty okazały się korzenie, które w przypadku preparatu ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> rośliny zaczęły tracić już po 3 dniach hodowli (fot. 2). Ponadto w przypadku tego preparatu pojawiły się liczne chlorozy liści, oraz plamy nekrotyczne dotyczące głównie brzegów liści i redukcja zielonej powierzchni blaszek liściowych (fot. 2, 3c)



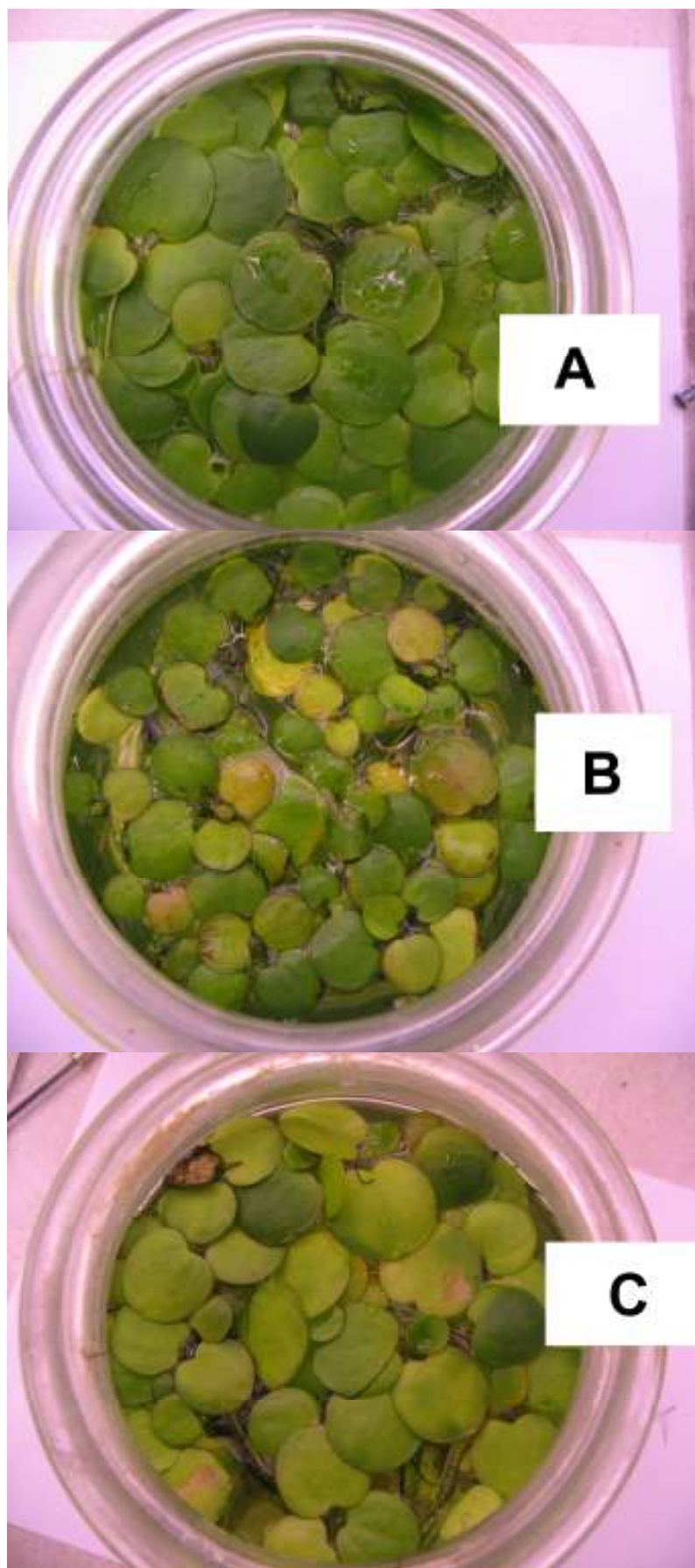
Wykres 12. Sucha masa liści i korzeni *Limnobium laevigatum* poddanej działaniu preparatów ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup> w przeliczeniu na 1 roślinę, w porównaniu do kontroli. Preparat podano w stężeniach zalecanych do stosowania w akwarium.



Wykres 13. Sucha masa liści i korzeni *Limnobium laevigatum* poddanej działaniu preparatów ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup> w przeliczeniu na 1 roślinę, w porównaniu do kontroli. Preparat podano w stężeniach zalecanych do stosowania w akwarium. Wyniki podano jako procent kontroli.



Fot 2. Fotografia 3 losowych prób *Limnobium laevigatum* po 14 dniach traktowania preparatami antyglonowymi w dawkach zalecanych przez producenta. Zdjęcia przedstawiają kolejno: A – kontrola, B – ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup>, C- Tropical Algin<sup>®</sup>.



Fot 3. Fotografia 3 losowych prób *Limnobium laevigatum* po 14 dniach traktowania preparatami antyglonowymi w dawkach zalecanych przez producenta. Zdjęcia przedstawiają kolejno: A – kontrola, B - ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup>, C- Tropical Algin<sup>®</sup>.

## IV. Dyskusja

### 1. Wpływ preparatów antyglonowych na wzrost glonów *Pediastrum*

W pracy wykorzystano dwa preparaty antyglonowe: ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> oraz Tropical Algin<sup>®</sup>. W przypadku pierwszego z nich skład, ze względu na tajemnicę firmy jest nieznany. Drugi z preparatów zawiera w swoim składzie siarczan miedzi i jego wpływ na rośliny wodne będzie rozpatrywany pod kątem miedzi a wspierany literaturą na temat wpływu tego pierwiastka na vegetację roślin.

Badanie wpływu antyglonów na rośliny wodne jest rodzajem testu na fitotoksyczność tych substancji. Nie ma jednego specyficznego gatunku lub grupy gatunków, która mogłaby służyć jako uniwersalny wskaźnik wszystkich możliwych zanieczyszczeń w wodzie, takich jak pestycydy czy metale ciężkie, które wchodzi w skład preparatów przeciwko glonom. (Raskin i wsp., 1997; Lovett-Doust i wsp., 1994). W pracy wykorzystano glon *Pediastrum* oraz kilka roślin wyższych m.in. *Lemna minor* - jeden z najpopularniejszych gatunków używanych w testach na fitotoksyczność, który posłużył do wyselekcjonowania preparatów do dalszych badań. Do grupy roślin całkowicie zanurzonych należał: *Echinodorus longiscapus*, który posłużył jako gatunek pomocny przy opracowaniu metodyki oraz *Echinodorus pellucidus*, który wykorzystano do właściwego eksperymentu. Ostatnim reprezentantem makrofitów było pływające *Limnobium laevigatum*.

Pierwszym z przeprowadzonych doświadczeń był wpływ preparatów na glony z rodzaju *Pediastrum*. W jego przypadku zastosowano dobrą i sprawdzoną metodę pomiaru zawartości barwników fotosyntetycznych: chlorofilu a, b, i karotenoidów (Wang i Freemark, 1995). Do pożywek nie dodano glukozy ani innej substancji organicznej w celu wyeliminowania możliwości przejścia na miksotroficzny sposób odżywiania populacji glonów. Według Gumińskiego (1990) w przypadku braku związków organicznych w pożywce, nie wymaga ona zachowania szczególnej sterylności. Bakterie rozwijające się w kulturze glonów mogą wpływać na nie nawet stymulująco z racji swojego symbiotycznego charakteru. Mimo tego w przeprowadzanych doświadczeniach zadbano o wysoką sterylność kultur glonowych, przez cały okres eksperymentu.



Preparat ZMF (wykres 1a) działał niekorzystnie na glony już w dawce zalecanej przez producenta powodując całkowite ich wyeliminowanie. Wyższe dawki preparatu działały tak samo skutecznie. Głównie to zasugerowało jego dalsze użycie w badaniach – żaden z innych preparatów testowanych we wstępnej fazie doświadczeń nie posiadał tak wysokiej skuteczności w zwalczaniu glonów.

Literatura dowodzi, że jednym z najbardziej toksycznych metali mającym negatywny wpływ na wzrost glonów jest miedź (obecna w preparacie Tropical Algin<sup>®</sup>), zarówno w formie kationu jedno-, jak i dwudodatniego (Fargasova A., Bumbalova A., Havranek E., 1999). Określana jest nawet mianem najbardziej toksycznego metalu na fotosyntetyzujące organizmy wodne (Dirilgen i Inel, 1994). w szczególności działająca niekorzystnie na zawartość chlorofilu a (Admiraal et al., 1995). Dane te spowodowały że jako drugi preparat do badań wybrano Tropical Algin<sup>®</sup>) zawierający w swoim składzie siarczany miedzi.

Toksyczny wpływ miedzi na glony zależy głównie od gatunku – jego fizjologicznej i ekologicznej kondycji oraz chemicznej formy metalu w pożywce (Sunda i Guillard, 1976). Wpływ miedzi zależy też bardzo silnie od rodzaju użytej pożywki (Ivorra et al., 1995) – np. Hoaglanda czy Knoppa. Badany preparat miedziowy, w dawce zalecanej do stosowania w akwarium, nie powodował znaczących zmian w zawartości chlorofilu a i b glonów w porównaniu do kontroli (wykres 1b). Nie można jednak jednoznacznie interpretować tych wyników z racji dużych rozrzutów pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami. Wnioski z wpływu tego preparatu są dyskusyjne - świadczyć to może o niedokładności metody, lub też o większej niż u innych glonów odporności *Pediastrum* (używanego w niniejszej pracy) na jony miedzi. Podwójna dawka preparatu powodowała już znaczną redukcję zawartości chlorofilu a i b w stosunku do kontroli (niemal 40% - wykres 1b). W tym miejscu warte zauważenia są obserwacje dokonane na gatunku *E. longiscapus*, które świadczą o wydajniejszym działaniu preparatu miedziowego na glony niż wskazywały by na to pomiary dokonane na *Pediastrum*. Cylindry z roślinami kontrolnymi były w większym stopniu zagłonięte niż cylindry z zastosowanym preparatem w dawce z instrukcji stosowania, co świadczy o jego hamującym działaniu na wzrost glonów w naczyniach z tym antyglonem.

Biorąc pod uwagę oba preparaty, ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> okazał się o wiele skuteczniejszy w działaniu antyglonowym od środka firmy Tropical.

## 2. Wpływ preparatów na plonowanie *Lemna minor*

W przypadku makrofitu *L. minor* preparat ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> po 14 dniach traktowania powodował redukcję biomasy kolejno: o 20% dla dawki zalecanej, 40% dla dawki 2x i 44% dla 10x (wykres 2a). Świadczy to o jego niekorzystnym działaniu na tę roślinę. Badania z udziałem pierwiastków radioaktywnych dowiodły, że główna ścieżka przemieszczania się metali w roślinie wodnej polega na ich akumulacji przez korzenie a następnie translokacji do części naziemnych (Jackson, 1998). Utrata korzeni już po kilku dniach stosowania preparatu ZMF sugeruje jego akumulację w tej części rośliny i wskazuje na przeciwdziałanie transportowi jego toksycznych substancji do dalszych partii.

Badania (Miretzky i wsp. 2004, Mukherjee i wsp. 2004) wskazują na wysoką zdolność akumulacji miedzi przez *L. minor*. Możliwość dużej akumulacji miedzi przez rzęś nie wyklucza faktu, że zakumulowana Cu wpływa negatywnie na jej metabolizm i wzrost. W moich doświadczeniach preparat miedziowy redukował biomasę *L. minor* aż o 40% (dawka 1 i 2x – wykres 2b). Różnorodne badania dowodzą, że stężenie miedzi wyższe niż 1μM jest potencjalnym inhibitorem fotosyntetycznego transportu elektronów i jest odpowiedzialne za degradację wewnętrznej struktury chlorofilu (Ouzounidou, 1994). Dobrze znanym negatywnym wpływem jest inhibicja wzrostu i zmiana przepuszczalności błon plazmatycznych (Ouzounidou et al., 1992) oraz podmiana kofaktorów w kluczowych enzymach. Podmianie tej ulega np. magnez, który jako niezbędny element w cząsteczce chlorofilu odpowiada za zieloną barwę liści (Küpper i wsp., 1996; Stoyonova i Tchakolova, 1993, Rabe i wsp., 1982; Brown i Rattigan, 1979). W testowanych przeze mnie roślinach traktowanych preparatem miedziowym następowała redukcja zawartości barwników fotosyntetycznych – starsze liście charakteryzowały się rozległą chlorozą, co może wskazywać na niedobór magnezu związany z toksycznym wpływem miedzi (fot. 1) (Kopcewicz i Lewak, 2002).

Preparat ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> powodował mniejsze szkody dla *L. minor* niż środek firmy Tropical powodujący dwukrotnie większą redukcję biomasy (wykres 2: a, b).

### 3. Dyskusja nad metodyką doświadczeń z roślinami wodnymi

Metodykę doświadczeń z pomiarem parametrów fotosyntetycznych opracowano na podstawie testów i pomiarów fotosyntezy gatunku *Echinodorus longiscapus* zbliżonego morfologią, rozwojem i sposobem wzrostu do *E. pellucidus*, który był właściwym obiektem badań. Z racji braku odpowiedniej literatury na temat metodyki *E. longiscapus* posłużył jako gatunek testowy do opracowania warunków doświadczenia dla submersyjnych form roślin błotnych. W jego przypadku zastosowano 10% pożywkę Hoaglanda (mikroelementy w trzykrotnym rozcieńczeniu), która nie była podmieniana przez cały czas eksperymentu (14 dni). W tym czasie w cylindrach doszło do wykwitnięcia glonów planktonowych i znacznego pokrycia glonami liści testowanych roślin. Po 7 i 14 dniach wykonano pomiary fluorescencji chlorofilu i fotosyntezy netto, które wykazały silne aberracje związane najprawdopodobniej z glonową powłoką liści, której nie udało się dokładnie usunąć nie uszkadzając liści. Równoległe z takim doświadczeniem przygotowano próbę, w której pożywka po 7 dniach była podmieniona na świeżą wraz z odpowiednim stężeniem środka antyglonowego. Próba ta była wolna od zakwitnięcia glonów. Obserwacja ta pozwoliła dopracować metodykę doświadczenia dla pozostałych roślin wodnych.

Rośliny wodne usuwają metale z wód, przede wszystkim dzięki pobieraniu korzeniowemu. Dla tych z nich, które posiadają korzenie, ale nie mają one fizycznego kontaktu z podłożem, woda jest niewątpliwie głównym źródłem pobieranych substancji (Biernacki i wsp., 1997; Biernacki i Lovett-Doust, 1997; Salt i wsp., 1998, Jackson 1998, Miretzky i wsp. 2004). Na tej podstawie zrezygnowano z wprowadzenia podłoża do doświadczeń z *E. longiscapus* i *E. pellucidus*.

#### 4. Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną *E. pellucidus*

Środek ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> nie wywoływał wpływu na wartość potencjalnej wydajności PSII. Jego niekorzystny wpływ objawiał się natomiast przy pomiarze aktualnej wydajności PSII, który to parametr określa aktualną sprawność fotosytemu II. Jego wartość rzutuje również na utylizację produktów fazy jasnej (ATP i NADPH) w fazie ciemnej fotosyntezy (Kitao i inni 1997). Po 7 dniach, parametr ten był redukowany do 60% wartości kontroli, co świadczy o efektywnym, niepożądanym działaniu preparatu na badane rośliny. Po dwóch tygodniach stosowania testowany parametr wzrastał o ok. 20% (wykres 4b), co może świadczyć o uruchomieniu przez rośliny systemów obronnych przed czynnikami stresogennymi, przede wszystkim skoncentrowanych na podtrzymaniu wydajnej fotosyntezy. Dlatego pozytywne wyniki parametrów fotosyntetycznych nie przekładają się na morfologię badanych roślin. W przypadku preparatu ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> liście charakteryzowały się licznymi chlorozami i towarzyszyły im plamy nekrotyczne na brzegach liści – co jest efektem niepożądanym w akwarium.

Nie znaleziono literatury traktującej o wpływie miedzi na gatunki z rodzaju *Echinodorus* (popularnych w akwariach żabienic). Dane z obserwacji uprawy akwariowej, potwierdzone przez wielu doświadczonych akwarystów, sygnalizują negatywny wpływ miedzi zawartej w środkach antyglonowych na inne gatunki roślin akwariowych – zarówno te, na które wpływ został wielokrotnie potwierdzony doświadczalnie (*Lemna minor*, *Elodea canadensis*, *Vallisneria americana*) jak i te nie potwierdzone (zapewne z powodu bardziej problematycznej uprawy i kłopotu z uzyskaniem odpowiedniej ilości egzemplarzy do badań).

Tropical Algin<sup>®</sup> podobnie jak ZMF nie miał wpływu na wartości potencjalnej wydajności PSII (wykres 3a, b), a na wartość wydajności aktualnej wpływał redukując ją poniżej 50% kontroli po I tygodniu traktowania (wykres 4b). Wiadomym jest, że miedź ma negatywny wpływ na proces fotosyntezy. Zauważa się wtedy znaczny spadek aktywności PSII. Następuje spadek natężenia fotosyntezy spowodowany zakłóceniem transportu elektronów i rozkładem wewnętrznej struktury tylakoidu po donorowej stronie PSII. Dowodem na to jest spadek fotosyntetycznego wydzielania tlenu spowodowany uszkodzeniem błon tylakoidowych – w wyniku peroksydacji lipidów bądź ich hydrolizy i uwalniania kwasów tłuszczowych. Wolne kwasy tłuszczowe

hamują aktywność PSII nie naruszając pierwotnych procesów fotochemicznych centrum (Kopcewicz i Lewak, 2002). Po 14 dniach stosowania środka w moich doświadczeniach wartości wydajności aktualnej rosły do 71% kontroli, co wskazywałoby na uruchomienie mechanizmów związanych z tolerancją roślin na miedź (wykres 4b).

W przypadku wpływu preparatu Tropical Algin<sup>®</sup> na fotosyntezę netto – zarówno w pierwszym jak i drugim tygodniu traktowania parametry były lepsze o ok. 40% od wyników kontrolnych (wykres 5a, b). Najprawdopodobniej było spowodowane powłoką glonową, która mimo obecności preparatów antyglonowych powstawała na ścianach naczyń hodowlanych i liściach zanurzonych roślin. Obecność fotosyntetyzujących glonów najprawdopodobniej zaburzała odczyt wymiany gazowej a otrzymane wyniki uniemożliwiają prawidłową interpretację kondycji samej rośliny.

## **5. Wpływ preparatów na aktywność fotosyntetyczną *L. laevigatum***

Tropical Algin<sup>®</sup> powoduje 31% spadek potencjalnej wydajności PSII ( $F_v/F_m$ , wykres 6b). Parametr ten oznaczający stosunek fluorescencji zmiennej do maksymalnej określa potencjalną, maksymalną wydajność kwantową PSII. Dla zdrowych liści roślin lądowych, z normalnie funkcjonującym aparatem fotosyntetycznym stosunek ten wynosi  $0,832 \pm 0,0004$  (Björkman i Demmig, 1987) a jego obniżenie świadczy o zahamowaniu pierwotnych procesów fotochemicznych w centrum fotoukładu II. Spadek  $F_v/F_m$  sugeruje zakłócenie transportu elektronów i rozkład wewnętrznej struktury tylakoidu po donorowej stronie PSII (Ouzounidou, 1993), co do której istnieje przekonanie, że to właśnie ona jest pierwszym miejscem toksycznego wpływu metali ciężkich (Krupa i Baszyński, 1995).

ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> nie powodował zmian w potencjalnej wydajności fotosystemu PSII. Jednak jego wpływ na aktualną wydajność był już znaczny i wynosił 29% sugerując zaburzenie transportu elektronów w PSII. i jak wynika z pracy Kitao i wsp. (1997) na zaburzenia w wykorzystaniu produktów fazy jasnej w cyklu Celvina. Warty zauważenia jest, że zarówno w przypadku preparatu ZMF jak i Tropical po 2 tygodniach traktowania nimi roślin, aktualna wydajność PSII osiągała 93% wartości kontrolnej co wskazuje na większą odporność tej rośliny w porównaniu do *E. pellucidus*

(71% - wykres 4b). Wykazano niejednokrotnie, że makrofity wodne zdolne do ukorzeniania się w podłożu są bardziej wrażliwe na metale ciężkie od roślin pływających (Lewis, 1995; Lovett-Doust i wsp. 1994).

Pomiary wydajności fotosyntezy netto wskazują na jej 39% spadek w stosunku do kontroli po pierwszym tygodniu traktowania preparatem ZMF (wykres 8a). Po 2 tygodniach parametr ten osiągał 70% kontroli co świadczy o trwałych zaburzeniach związanych z asymilacją CO<sub>2</sub> w fazie ciemnej przez badane rośliny. W przypadku preparatu miedziowego zaobserwowano podobną tendencję.

## 6. Wpływ preparatów na wzrost i zawartość miedzi u *L. laevigatum*

Działanie ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> charakteryzowało się obumieraniem korzeni już po pierwszych dniach traktowania tym antyglonem (fot. 2). Po 14 dniach w przeliczeniu na jedną roślinę nastąpiła redukcja suchej masy korzeni do 30% w stosunku do kontroli (wykres 12). Utratę korzeni pod wpływem działania tego środka zaobserwowano już wcześniej u *L. minor* – wskazuje to na typowy objaw działania w przypadku roślin pływających, u których pobieranie korzeniowe pełni nadrzędną rolę. Działa tu zapewne mechanizm zewnątrzkomórkowej ochrony przed niekorzystnym działaniem składników preparatu. Pod wpływem preparatu po 14 dniach blaszki liściowe różniły się już znacząco od liści kontrolnych – cechowała je zaawansowana chloroza i martwica brzegów liści (fot. 3b) – objawy charakterystyczne dla zaawansowanego niedoboru magnezu i żelaza (chloroza młodych liści) Świadczy to o uszkodzeniu struktury chloroplastów (Kopcewicz i Lewak, 2002).

Preparat miedziowy powodował mniejsze uszkodzenia w porównaniu do ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> aczkolwiek znaczące. W jego przypadku nastąpiła redukcja suchej masy korzeni do 53% a liści do 86% wartości kontroli Podobne efekty zaobserwowałem w przypadku roślin traktowanych środkiem miedziowych, gdzie następowała redukcja suchej masy liści i korzeni po 14 dniach traktowania preparatem (wykres 11, 12, fot 2). Chlorozy występowały w tym przypadku głównie na starszych liściach co wskazuje na uszkodzenie chlorofilu poprzez zastępowanie magnezu przez jony miedzi (Küpper i wsp., 1996; Stoyonova i Tchakolova, 1993, Rabe i wsp., 1982; Brown i Rattigan, 1979).

## V. Wnioski

1. Badania poziomu chlorofilu wykazały, że oba środki antyglonowe skutecznie obniżają namnażanie się glonów. Preparat ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> eliminuje je całkowicie a Tropical Algin<sup>®</sup> redukuje do 64% w porównaniu do kontroli.
2. Oba preparaty w stężeniach wpływających na glony nie pozostają bez wpływu na rozwój i wzrost rzęsy oraz *E. pellucidus* i *L. laevigatum* wywołując liczne chlorozy.
3. Zarówno ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> jak i Tropical Algin<sup>®</sup> zaburzają proces fotosyntezy ograniczając sprawność fotosystemu II oraz asymilację CO<sub>2</sub>.
4. Skutkiem zaburzonej fotosyntezy jest zmniejszona intensywność wzrostu i redukcja świeżej i suchej masy roślin
5. Badane antyglony działają z różną siłą w zależności od gatunku rośliny. Mniej odporne na ich działanie są rośliny zanurzone. Większą tolerancją cechują się rośliny pływające po powierzchni wody.
6. Miedź przynajmniej u roślin pływających akumuluje się w równym stopniu w liściach jak i korzeniach
7. Jedną z ujemnych cech preparatu ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> jest jego niekorzystne działanie na kondycję korzeni roślin pływających.

## **VI. Podziękowania**

Chciałbym serdecznie podziękować Pani prof. Grażynie Kłobus za umożliwienie mi realizacji tematu pracy w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Botaniki UWr.

Szczególne podziękowania kieruję w stronę mojego promotora, Pana dr Marka Burzyńskiego (Zakład Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Roślin UWr.) za opiekę merytoryczną i wkład w rzetelne omówienie kwestii zawartych w pracy

Osobne podziękowania składam również Panu dr Ryszardowi Kamińskiemu (kierownikowi działu roślin wodnych i błotnych Wrocławskiego Ogrodu Botanicznego) za pomoc w zdobyciu materiału roślinnego do badań.

W tym miejscu chciałbym także podziękować Panu Piotrowi Synowcowi, właścicielowi sklepu DISCUS MYSIAR za dostarczenie mi niezbędnych preparatów antyglonowych.

Dziękuję również środowisku akwarystycznemu za zachęcanie mnie do realizacji tematu tego typu.

© Piotr Baszucki, basha@eranet.pl

Serwis Roślin Wodnych i Akwariowych (SRWiA) - [www.holenderskie.pl](http://www.holenderskie.pl)

Wszelkie prawa zastrzeżone.



## Literatura

- Benenati, F. Keynote. Address: Plants – keystone to risk assessment. In *Plants for Toxicity Assessment*. ASTM STP 1091, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 238-71 (1990).
- Biernacki M., Lovett-Doust I., Lovett-Doust L., 1996. *Vallisneria americana* as biomonitor of aquatic ecosystems: leaf-to-root surface area ratios and organic contamination in the Huron-Erie corridor. *Journal of Great Lakes Research* 22, 289-303.
- Biernacki M., Lovett-Doust I., Lovett-Doust L., 1997. Laboratory assay of sediment phytotoxicity using the macrophyte *Vallisneria americana*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 472-478.
- Blanck, H., Wallin, G., Wangberg, S. Species – dependent variation in algal sensitivity to compounds. *Ecotos. Environ. Safety*, 8, 339-51, 1984.
- Blinova I., Use of Freshwater Algae and Duckweeds for Phytotoxicity Testing. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com), 10.1002/tox.20042 (2004)
- Brown L.S., Lean D.R.S., Toxicity of selected pesticides to lake phytoplankton measured using photosynthetic inhibition compared to maximal uptake rates of phosphate and ammonium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.14.No1.pp.93-98, 1995
- Ćwiczenia z Fizjologii Roslin pod redakcją J. Buczka. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 1992.
- Dirilgen N. I Inel Y., “Effects of zinc and copper on growth and metal accumulation in duckweed, *Lemna minor*, *Bull Environ Contam. Toxicol* 53, 442-449 (1994).
- Eullaffroy P., G\Vernet G., The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Water Research* 37 (2003) 1983-1990
- Falkowski P.G., Raven J.A., Aquatic photosynthesis. London, U.K.: Blackwell Science (1997).
- Falkowski P.G., The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Re.* 39, 235-258 (1994)
- Falkowski, Raven .VA Mycorrhizae in Water, www.biology.kenyon.edu, (1997).
- Fargasova A.,Bumbalova A., Havranek E..Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mo<sup>6+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, V<sup>5+</sup>) In freshwater alga *Scenedesmus Quadricauda*, *Chemosphere*, Vol. 38, No. 5, pp. 1165-1173, 1999.
- Foyer C.H., Oxygen metabolism and elektron transport in photosynthesis. In: Scandalos, J.G. (Ed.), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, London, pp. 587-621.1997
- Geoffroy L., Frankart C., Eullaffroy P. „Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin”, *Environmental Pollution* 131 (2004) 233-241.

- Gumiński S., Fizjologia glonów i sinic. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1990.
- Hall J. L. „Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance” *Jurnal of Experimental Botany*, Januar 2002
- Jackson L.J., Paradigms of accumulation in rooted aquatic vascular plants. *The science of the Total Environment* 219 (1998) 223-231.
- Kamal M., Ghany A.E., Mahmoud N., Côte R., Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environmental International* 29 (2004) 1029-1039
- Kitao, M., Lei, T.T., Koike, T.: Effects of manganese toxicity on photosynthesis of white birch (*Betula platyphylla* var. *Japonica*) seedlings. - *Physiol. Plant.* **101**: 249-256, 1997.
- Kopcewicz J., Lewak S., „Fizjologia roślin”, PWN Warszawa 2002.
- Korner S., Das S.K., Veenstra S., Vermaat J.E. The effect of pH variation At the ammonium/ammonia equilibrium In wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquat Bot* 71:71-78 (2001)
- Kovacs M, Nary I, Toto L. The mikroelement kontent of some submerged and floating aquatic plants. *Acta Bot Hung* 1984; 30:173-185.
- Lewis Michael A. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution* 87 (1995) 319-336
- Mal K., Adorjan P., Corbett A., “Effect of copper on growth of an aquatic macrophyte, *Elodea canadensis*”, *Environmental Pollution* 120 (2002) 307-311.
- Malewa M.G., Nekrasova G.F., Bezel' V.S., The Response of Hydrophytes to Environmental Pollution with Heavy Metals. *Russian Journal of ecology*, Vol.35,No.4.2004, pp.230-235
- Miretzky P., Saralegui A., Cirelli A.F., Aquatic macrophytes potential for simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 57 (2004), 997-1005.
- Mukherjee S., Mukherjee S., Bhattacharyya P., Duttagupta A.K., Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*; field and laboratory studies. *Environment International* 30 (2004), 811-814.
- Nowicka A., Dystrybucja metali ciężkich między apoplastem a protoplastem. Praca magisterska (2004)
- Rascio N., The Underwater Life of Secondarily Aquatic Plants: Some Problems and Solutions. *Critical Reviews in Plant Science*, 21 (4): 401-427 (2002)
- Rovira A.D. I wsp. 1979 „Origin nature and nomenclature of organic materials in the rhizosphere”.
- Samecka-Cymerman A, Kempers AJ. Toxic metals in aquatic plants surviving in surface water polluted by copper mining industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59 (2004) 64-69.
- Samecka-Cymerman A, Kempers AJ. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macrophytes around Wroclaw, Poland. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1996 Dec;35(3):242-7.

Samecka-Cymerman A, Kempers AJ. Preliminary investigations into the bioaccumulation of mercury by the liverwort *Scapania undulata* L. (Dum). *Ecotoxicol Environ Saf.* 1995 Jun;31(1):57-61.

Saygideğer S., Doğan M., Lead and Cadmium Accumulation and Toxicity In the Presence of EDTA In *Lemna mino* L. and *Ceratophyllum demersum* L., *Bull Environ.Contam. Toxicol* (2004) 73:182-189

Teisseire H., Couderchet M., Vernet G., Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Pollution* 106 (1999) 39-45.

Teisseire H., Couderchet M., Vernet G., 1998, Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 194-200.

Teisseire H., Vernet G., Is the 'Durion Effect' Due to a Herbicide Strengthening of Antioxidative Defenses of *Lemna minor*?. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66, 153-160 (2000).

Qian J.H., Zayed A., Zhu M.L., Yu M., Terry N., Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *J. Environ Qual* 1999;28(5):1448-56

Wahaab R., A., Lubberding H.J., Alaerts G.J., Copper and chromium (III) uptake by duckweed. *Wat.Sci.Tech.* Vol 32.No.11, pp.105-110, 1995

Williams Lorraine E. , Pittman Jon K., Hall J. L „Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants” *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 (2000) 104-126

Wójcik A., Tukendorf A. „Strategie unikania stresu w odporności roślin na metale ciężkie” *Wiadomości Botaniczne* 39 (3/4) : 33-40, 1995

Fotografie preparatów antyglonowych pochodzą z witryn internetowych producentów: [www.tropical.com.pl](http://www.tropical.com.pl) oraz [www.tetra.de](http://www.tetra.de).

## Summary

### **The effect of anti-algae chemicals on selected groups of aquatic plants.**

The subject of this study is the influence of anti-algae products on freshwater aquatic plants, especially plants growing in the planted aquariums. Anti-algae chemicals: ZMF ALGO-stop fix<sup>®</sup> (whose composition is unknown) and Tropical Algin<sup>®</sup> (whose includes copper) destroy algae effectively, but have a negative influence on water plants. They disturb the process of photosynthesis by limiting efficiency of PSII and CO<sub>2</sub> assimilation. Consequently, the plants suffer from reduced growth intensity and a reduction in fresh and dry mass. This study also proves the hypothesis that underwater plants are more sensitive to the influence of toxicants than floating plants.

*Keywords: Pediastrum, Lemna minor, Echinodorus pellucidus, Limnobium laevigatum, Aquatic plants, Anti-algae, Chlorophyll fluorescence, Aquarium*