



Pracownia studencka
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 2

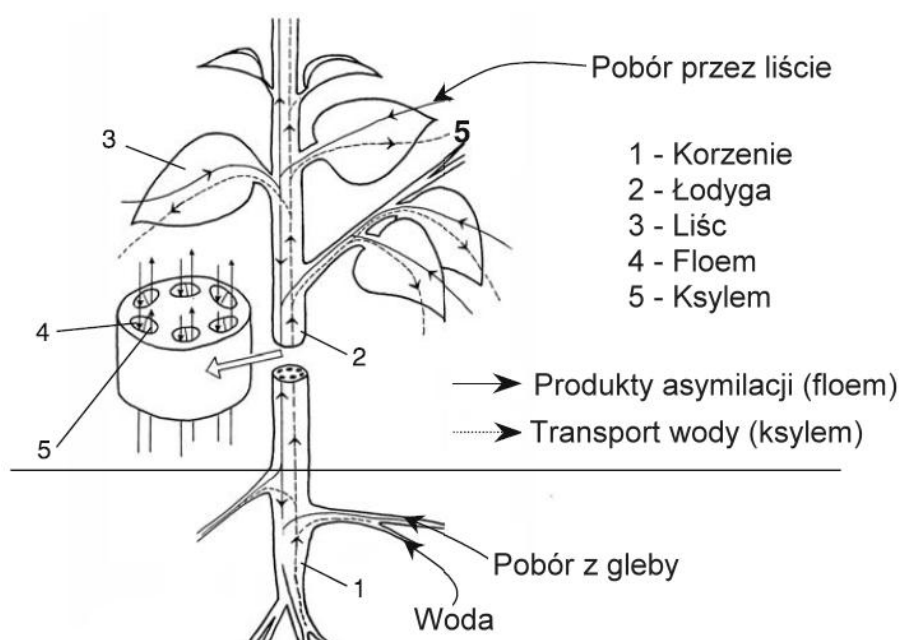
BADANIE TOKSYCZNOŚCI KWASU 4-CHLORO-2-METYLOFENOKSYOCTOWEGO (MCPA) WOBEC ROŚLIN JEDNOLIŚCIENNYCH I DWULIŚCIENNYCH

Chemia Środowiska

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Ocena ryzyka, związanego z obecnością substancji chemicznej w środowisku, obejmuje wiele parametrów chemicznych, fizycznych i toksykologicznych. Niezbędne jest określenie możliwego narażenia, związanego głównie ze sposobem użytkowania substancji chemicznej. Następnie, ocenia się możliwość przemieszczania się związku na podstawie jego zachowania w różnych komponentach środowiska (tj. w wodach powierzchniowych i głębinowych, atmosferze, glebie), przy uwzględnieniu trwałości substancji – czasu rozpadu zarówno pod wpływem czynników abiotycznych (np. promieniowanie, temperatura), jak i biotycznych (metabolizowanie przez organizmy żywe, głównie mikroorganizmy). Kolejnym ważnym etapem jest określenie toksyczności zarówno związku, jak i produktów jego rozpadu, na narażone organizmy. Rutynowo ocenia się toksyczność względem drobnych bezkręgowców wodnych (skorupiaki, mięczaki), roślin wodnych (glony, rzadziej rośliny wyższe), ryb, a także zwierząt lądowych, od owadów i płazów poczynając, na ssakach kończąc. Nieco rzadziej sprawdza się działanie substancji chemicznych na rośliny lądowe. Wpływ toksyczny na rośliny (zwany **fitotoksycznością**) może zachodzić w różnych stadiach rozwojowych rośliny, być uzależniony od warunków wzrostu, a także przynależności systematycznej. Niektóre substancje będą działały tylko lokalnie, w miejscu wchłonięcia, inne systemowo – po wchłonięciu będą przemieszczać się w organizmie rośliny. Część związków będzie wykazywać toksyczność tylko po wchłonięciu przez liście, inne – tylko po przyjęciu przez system korzeniowy, część zaś niezależnie od drogi przyjęcia. Substancje wchłonięte przez system korzeniowy będą zwykle przemieszczać się w roślinie przez ksylem, razem z wodą pobraną przez korzenie i transportowaną do nadziemnych części rośliny. Związki wchłonięte przez liście będą z kolei zazwyczaj przenoszone do innych części organizmu poprzez floem, wraz z produktami fotosyntezy (rysunek 1).

Ocena fitotoksyczności jest szczególnie istotna w przypadku substancji, mających zastosowanie w rolnictwie, przede wszystkim pestycydów. Ze względu na masowe stosowanie i możliwość przedostawania się poza miejsce pierwotnego użycia, na działanie pestycydów narażone będą nie tylko chronione uprawy i zwalczane chwasty, ale także inne rośliny uprawne oraz żyjące dziko. Nie można także wykluczyć działania toksycznego wobec chronionych upraw. Sprawia to, że w przypadku środków ochrony roślin testowane jest zwykle działanie toksyczne wobec: **(I)** gatunków roślin uprawnych, które mają być ochraniające, **(II)** innych roślin uprawnych, **(III)** docelowych chwastów, **(IV)** innych roślin dzikich. Konieczne jest także testowanie wobec roślin z różnych jednostek systematycznych (co najmniej dla jedno- i dwuliściennych).



Rysunek 1. Drogi transportu substancji chemicznych w organizmie rośliny lądowej (wg. [1]).

Powszechnie stosowanymi procedurami testowania fitotoksyczności związków chemicznych są testy opracowane przez OECD, dotyczące inhibicji kiełkowania nasion oraz wpływu substancji na wzrost roślin [2, 3]. W przypadku konieczności zbadania poboru związku oraz jego rozmieszczenia w organizmie rośliny zastosowanie ma test Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska [4]. Powtarzalne i nie budzące wątpliwości testy łatwiej jest wykonać przy narażeniu rośliny poprzez system korzeniowy, dlatego też takie testy dominują w ocenie fitotoksyczności. Dość powszechnie wykorzystuje się także hodowle hydroponiczne (roztwory substancji pokarmowych zastępują glebę), a także różnego rodzaju hodowle tkankowe.

Wybór metody testowania musi uwzględniać sposób działania danego związku (np. pestycydu działającego kontaktowo na liście nie należy testować przy podaniu poprzez system korzeniowy), jego trwałość, rozpuszczalność w wodzie, lotność i inne cechy. Należy brać pod uwagę sposób przedostawania się substancji do środowiska, co pozwala na właściwą ocenę narażenia (np. czy związek jest stosowany w postaci oprysków? w pobliżu zbiorników wodnych? w jakiej części okresu wegetacyjnego?). Podczas przebiegu testu powinny zostać zachowane stałe warunki uprawy. Należy brać pod uwagę możliwość wpływu warunków środowiska (np. temperatura, pH gleby) na wyniki. Niezależnie od wybranej metody testowania, zazwyczaj stosuje się szeroki zakres stężeń (4-5 różnych stężeń w ustalonych wcześniej granicach) oraz grupę kontrolną, nie narażoną na działanie związku. Dla każdego stężenia wykonuje się zwykle co najmniej 4 powtórzenia.

2. Chemia środowiska – badanie toksyczności MCPA wobec roślin jedno- i dwuliściennych **4**

Test dotyczący wpływu związków chemicznych na wzrost roślin lądowych (wytyczna OECD nr 208) pozwala na określenie skutków działania substancji na nasiona i wczesne stadia rozwojowe roślin po jednokrotnym podaniu związku do gleby. Szczegóły dotyczące wykonania zostaną podane w dalszej części instrukcji. Podstawowe założenia testu są następujące:

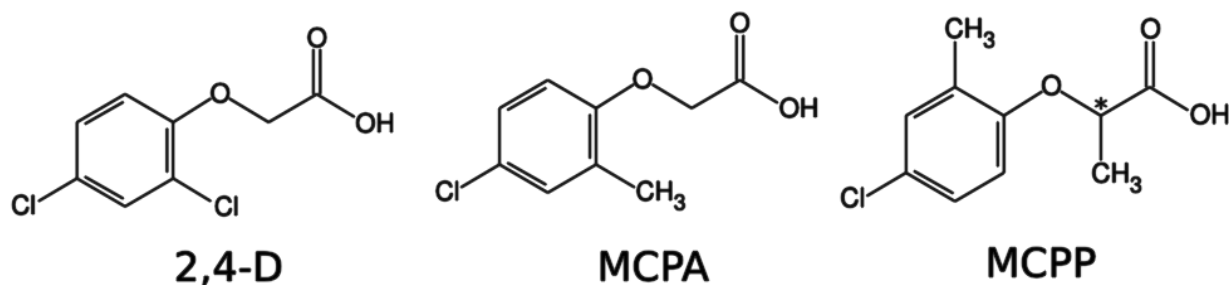
- test jest wykonywany wobec grupy kontrolnej
- związek chemiczny jest podawany do gleby przed wysianiem nasion; stężenie związku jest wyrażane w mg kg^{-1} **SUCHEJ MASY** gleby
- stosuje się lekkie piaszczyste gleby o niskiej zawartości materii organicznej lub sztuczne podłoża do uprawy roślin
- test trwa nie krócej niż dwa tygodnie od momentu pojawienia się przynajmniej 50% roślin w grupie kontrolnej
- wyniki testu nie są wiarygodne, jeśli w grupie kontrolnej w trakcie trwania testu wykiełkowało mniej niż 70% wszystkich nasion
- rośliny kontrolne powinny rosnać w normalny sposób (brak zniekształceń, przebarwień, nekrozy tkanek)
- wszystkie rośliny powinny rosnać w identycznych warunkach i przy zastosowaniu tej samej gleby w tej samej ilości

Po zakończeniu testu oceniane są widoczne zmiany w badanych roślinach (w szczególności zniekształcenia, przebarwienia, wyraźnie mniejsza lub większa wysokość siewek w stosunku do grupy kontrolnej). Ogólny wpływ związku w badanych stężeniach jest oceniany na podstawie:

- ilości siewek w każdej grupie
- ilości roślin o wyraźnych zmianach w budowie
- jeśli wystąpiła silna toksyczność po pojawieniu się roślin – ilość siewek, które nie przeżyły testu
- suchej masy części nadziemnych roślin z każdej grupy w stosunku do kontroli

W przypadku parametrów, które można określić liczbowo, należy opracować krzywą dawka – odpowiedź dla każdego parametru i wyznaczyć EC_{50} (stężenie związku, przy którym u 50% populacji stwierdzono wystąpienie danego efektu), a także NOEC (najwyższe stężenie, przy którym nie wystąpił efekt) i/lub LOEC (najniższe stężenie, przy którym efekt wystąpił). Jeśli test był wykonywany w powtórzeniach, wyniki są uśredniane. Jednokrotne badanie każdego ze stężeń może być stosowane w celu określania zakresu roboczego do właściwych testów, co pozwala na odrzucenie tych stężeń, które nie wywołują żadnych efektów (poniżej NOEC) lub wywołują efekt w całej badanej grupie roślin.

Dane dotyczące użycia pestycydów w Polsce wskazują na znaczny udział herbicydów w całkowitej masie stosowanych środków ochrony roślin. Herbicydy stanowią nawet 65% wszystkich stosowanych pestycydów, ze znacznym (nawet 50%) udziałem chlorowanych kwasów fenoksykarboksylowych. Związki te działają jak syntetyczne analogi auksyn indolowych (tj. hormonów wzrostu roślin) i wykazują zwykle silnie selektywne działanie toksyczne wobec roślin dwuliściennych. Z tego względu, stosowane są głównie w ochronie upraw zbóż, które w roku 2007 zajmowały w Polsce ponad 74% całkowitej powierzchni zasiewów. Omawiane związki mają szczególne znaczenie w ochronie upraw pszenicy, która stanowi z kolei blisko 20% całości upraw w Polsce. Dodatkowo, są dość mobilne w środowisku i mogą oddziaływać na znaczną odległość od miejsc pierwotnego stosowania, wpływając na rośliny inne niż docelowe. Wykazano, że w małych dawkach chlorowane kwasy fenoksykarboksylowe pobudzają wzrost roślin bez wyraźnych deformacji, jednak dawki większe powodują nieprawidłowy rozwój niektórych tkanek, co prowadzi do wad i często śmierci rośliny. Rośliny jednoliścienne wykazują znaczną odporność na działanie herbicydów z tej grupy, jednak przy znacznym narażeniu także obserwuje się efekty toksyczne. Niezależnie od grupy roślin, jedynie stosunkowo wysokie dawki powodują wyraźne ograniczenie kiełkowania nasion. Wpływ na rozwój młodych roślin jest znacznie większy, szczególnie u dwuliściennych. Najpopularniejsze substancje aktywne z tej grupy związków to kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), kwas 4-chloro-2-metylofenoksyoctowy (MCPA) i kwas 2-(4-chloro-2-metylo)-fenoksypropionowy (MCPP, mecoprop; tylko enancjomer (R)-(+), wykazujący aktywność względem roślin). Struktury wymienionych substancji są przedstawione na rysunku 2. Stosowane są zarówno pojedyncze związki, jak i ich mieszaniny. Handlowo dostępne preparaty zawierają różne ilości substancji aktywnej, zwykle w postaci soli lub estrów.



Rysunek 2. Wzory strukturalne najpopularniejszych herbicydów z grupy chlorowanych kwasów fenoksykarboksylowych.

2. Chemia środowiska – badanie toksyczności MCPA wobec roślin jedno- i dwuliściennych **6**

Ze względu na fakt, iż omawiane związki mają charakter słabych kwasów, w środowisku będą występować w formie zjonizowanej lub wolnego związku, w zależności od pH. Ujemny logarytm ze stałej dysocjacji związków przedstawionych na rysunku 2 (pKa) wynosi odpowiednio: dla 2,4-D 2,7; dla MCPA 3,1; dla MCPP 3,6. Oznacza to, że przy takich wartościach pH kwasy te są zjonizowane w 50%. Przy wyższym pH jonizacja następuje w większym stopniu, zaś w roztworach mocnych zasad substancje te występują w formie soli. Kwasy fenoksykarboksylowe w formie wolnej są słabo lub bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie (2,4-D: 620-900 mg/L, MCPA – praktycznie nierozpuszczalny do 800 mg/L, MCPP – około 700 mg/L), podobnie jak ich estry, natomiast sole są bardzo dobrze rozpuszczalne. Estry w większości nie są trwałe w środowisku i szybko ulegają hydrolizie do macierzystego kwasu. Dostępność herbicydów dla roślin może być uzależniona od pH środowiska, jakkolwiek w przypadku poboru przez korzenie możliwe jest zarówno wchłanianie formy wolnej związku, jak i formy zjonizowanej.

Celem niniejszego ćwiczenia jest określenie wpływu toksycznego różnych stężeń kwasu 4-chloro-2-metylofenoksyoctowego (MCPA) na rośliny jednoliścienne (kukurydza) oraz dwuliścienne (sałata), na etapie kiełkowania nasion oraz początkowego wzrostu młodych roślin. Wybór MCPA jest spowodowany stosunkowo większą trwałością tej substancji w glebie w porównaniu z np. 2,4-D.

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

UWAGA! Ćwiczenie jest wykonywane na dwóch zajęciach, z 2-3 tygodniową przerwą

I. CZĘŚĆ PIERWSZA – PRZYGOTOWANIE EKSPERYMENTU

1. Przygotować 1 dm³ 0,02 M roztworu wodorowęglanu sodu w wodzie wodociągowej
2. Odważyć próbkę około 60 g ($\pm$ 1 g) gleby na folii aluminiowej. Glebę rozłożyć cienką warstwą na folii i umieścić na 90 minut w suszarce w temperaturze 120°C. Po ostygnięciu zważyć glebę w celu ustalenia zawartości wody.
3. Określić kwasowość czynną i wymienną gleby. W tym celu, suchą glebę rozetrzeć w moździerzu i odważyć z niej 2 próbki po 5 g w zlewce poj. 50 cm³. Następnie, do zlewek dodać po 25 cm³ wody destylowanej (kwasowość czynna) lub 1M roztworu KCl (kwasowość wymienna) i energicznie mieszać, aż cały grunt przejdzie w zawiesinę (kilka minut). Zanurzyć papierek wskaźnikowy w zawieszynie lub umieścić kroplę zawieszyny na papierku (zaleca się odczekać, aż grubsze części opadną i przenieść kroplę zawieszyny na

2. Chemia środowiska – badanie toksyczności MCPA wobec roślin jedno- i dwuliściennych **7**

papierek wskaźnikowy, zamiast zanurzania go w zawieszynie). Po 30 s porównać zabarwienie papierka z załączoną do niego skalą, odczytując wartość pH.

4. Każdą z komór doniczki należy napełnić taką samą ilością (± 2 g) gleby tak, by jej lekko ubita warstwa znajdowała się około 1 cm poniżej krawędzi doniczki. Zestaw testowy dla każdego gatunku rośliny składa się z pięciu stężeń badanej substancji oraz grupy kontrolnej, po 4 powtórzenia (komory).
5. W każdej komórce umieścić jednakową liczbę (po 2) nasion wskazanych przez prowadzącego; nasiona powinny zostać umieszczone około 0,5 cm pod powierzchnią gleby, a powierzchnia lekko ubita palcami.
6. Znając zawartość wody w stosowanej glebie, obliczyć suchą masę gleby w każdej komórce wielodoniczki.
7. Jako, że MCPA jest obecne w wodzie częściowo w formie zawiesziny, bezpośrednio przed użyciem należy umieścić kolby z roztworem MCPA w łaźni ultradźwiękowej na 10 min., i odmierzać objętości (patrz punkt poniżej) po dokładnym wymieszaniu zawartości.
8. Z roztworów podstawowych MCPA przygotować takie objętości roztworów tego związku w wodzie wodociągowej, by całość wystarczyła na podlanie wszystkich komórek o danym stężeniu związku w glebie (na pojedynczą komórkę należy zastosować 20 mL odpowiedniego roztworu), a **końcowa zawartość w glebie** odpowiadała wartościom (w mg kg^{-1} suchej masy gleby): 30 mg, 20 mg, 10 mg, 5 mg, 1 mg; jako roztwór kontrolny zastosować wodę wodociągową w identycznej objętości.
9. Bezpośrednio po przygotowaniu, roztworami delikatnie i w miarę równomiernie podlać przygotowaną wcześniej glebę z wysianymi nasionami; następnie, w identyczny sposób podlać wszystkie grupy 20 mL 0,02 M roztworu NaHCO_3 . PROSZĘ CZYTELNIE OZNACZYĆ DONICZKI MARKEREM: PODGRUPA, GATUNEK ROŚLINY, STĘŻENIE ZWIĄZKU. Doniczki umieścić w miejscu wskazanym przez prowadzącego.

II. CZĘŚĆ DRUGA – ODCZYT I OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. W każdej grupie określić ilość siewek, ocenić ewentualne różnice w wyglądzie i budowie roślin w porównaniu z grupą kontrolną oraz opisać ewentualne wady rozwojowe (w szczególności odbarwienia, mniejsze lub większe rozmiary roślin, deformacje, nekrozę).
2. Wszystkie części nadziemne roślin z każdej grupy zebrać (OSOBNO DLA KAŻDEGO STĘŻENIA), umieścić na folii aluminiowej i umieścić w suszarce w temperaturze 70°C na 30 minut. Po tym czasie zważyć próbki materiału roślinnego na wadze analitycznej w celu

określenia suchej masy.

3. Zanieczyszczoną glebę umieścić w pojemniku wskazanym przez prowadzącego. Dokładnie umyć doniczki i usunąć napisy metanolem!

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. Na podstawie obserwacji narysować wykres: stopień inhibicji kiełkowania w zależności od stężenia związku. Należy przyjąć, że inhibicja w grupie kontrolnej wynosi 0%, a stężenie MCPA w grupie kontrolnej wynosi 0.
2. Sporządzić wykres: spadek suchej masy części nadziemnych roślin (jako ubytek w stosunku do grupy kontrolnej w %) w zależności od stężenia związku.
3. Dla obu zależności, jeśli jest taka możliwość, ocenić wartość EC_{50} (stężenie, przy którym zanotowano 50% inhibicję kiełkowania; stężenie, przy którym zanotowano 50% spadek suchej masy części nadziemnych w stosunku do grupy kontrolnej).

Materiały, zestaw szkła i sprzętu laboratoryjnego:

- doniczki
 - gleba
 - nasiona wybranych roślin jedno- i dwuliściennych
 - kolba miarowa 1 dm³
 - folia aluminiowa
 - metalowa łyżka – 3 szt.
 - zlewka 50 mL – 6 szt.
 - cylinder miarowy 25 mL – 6 szt.
 - bagietki szklane – 6 szt.
 - cylindry miarowe
 - pipety szklane
 - zlewki
- } do przygotowania roztworów MCPA, wg zapotrzebowania studentów
- pompka do pipet - 3 szt.
 - papierki wskaźnikowe
 - ręczniki papierowe
 - rękawiczki
 - łaźnia ultradźwiękowa

Odczynniki

- roztwory podstawowe soli sodowej MCPA w wodzie o stężeniu w przeliczeniu na wolny kwas: 500 mg dm⁻³ oraz 50 mg dm⁻³ (objętość 1 dm³)
- 1M roztwór KCl
- wodorowęglan sodu NaHCO₃
- metanol cz.

4. LITERATURA

1. Kvesitadze G., Khatishashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J.J., *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. Basis of Phytoremediation*, Springer-Verlag, Berlin 2006.
2. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. *Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test* (Test nr 208), 2006.
3. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. *Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test* (Test nr 227), 2006.
4. U.S. EPA, *Ecological Effects Test Guidelines – Plant Uptake and Translocation Test* (OPPTS 850.4800), 1996.
5. Grabińska-Sota E., Wiśniowska E., Kalka J., Toxicity of selected synthetic auxines—2,4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants, *Crop Protection*, **22**, 355-360, 2003.
6. Wells M.J.M., Yu L.Z., Solid-phase extraction of acidic herbicides, *Journal of Chromatography A*, **885**, 237–250, 2000.
7. Metcalf R.L., Pestycydy i zakres ich stosowania. W: *Pestycydy w środowisku* (red. R. White-Stevens), PWRiL, Warszawa 1977.
8. Żelechowska A., Biziuk M., Wiergowski M., Charakterystyka pestycydów. W: *Pestycydy. Występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie* (red. M. Biziuk), WNT, Warszawa 2001.
9. Komitet Redakcyjny Głównego Urzędu Statystycznego, Mały rocznik statystyczny Polski 2008. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Główny Urząd Statystyczny, Warszawa 2008.