ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXVIII, z. 1, 1975

Biologiczna analiza testowa śladowych ilości prometryny przy użyciu rośliny *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm.

BOGDAN ZAWADZKI

Instytut Warzywnictwa, Zakład Hodowli i Nasiennictwa, Skierniewice

B. Zawadzki (Research Institute of Vegetable Crops, Skierniewice, Poland): Acta Agrobotanica 28 (1): 57-66, 1975.

Biological test for trace amounts of herbicide in water using a water plant — Wolffia arrhiza (L.) Wimm.

Investigations were performed on the sensitivity of *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. to the herbicide 2-methylmercapto-4,6-diisopropylamino-1,3,5-triasine. The plant was found to be suitable for use in a biological test for quantitative estimation of the herbicide. The analysis was performed directly in water extracts by means of counting or weighing the plants.

WSTĘP

W analityce śladowych ilości pestycydów coraz powszechniej stosowane są rośliny i zwierzęta. Ciągły rozwój biologicznych metod analitycznych doprowadził do stworzenia w kilku przypadkach metod pozwalających ilościowo określić zawartość danego pestycydu w materiale roślinnym, czy w glebie (Kamiński 1964; 1965; Kamiński i wsp. 1969).

Herbicydy, środki służące do zwalczania chwastów, stosowane są coraz powszechniej i coraz częściej. Środki te, umiejętnie stosowane, nie stanowią zagrożenia dla biosfery, niemniej istnieje pilna potrzeba doskonalenia metod określania ich pozostałości. Opanowanie tych metod pozwala na śledzenie zachowania się herbicydów, np. w glebie czy w roślinie.

Opisana poniżej metoda ilościowego oznaczania śladowych ilości jednego z herbicydów z grupy pochodnych symetrycznych triazyn — prometryny (nazwa zwyczajowa) pozwala na określenie zawartości tego związku w badanym materiale do wielkości nie mniejszej niż 0,01 ppm.

Spośród roślin wodnych, stosowanych jako obiekty testowe, wymienić

należy glony. Między innymi Addison i Bardsley (1968) użyli glonu *Chlorella* w celu oznaczania pozostałości diuronu i prometryny.

Zaobserwowana w praktyce wrażliwość roślin wodnych (wyższych) na preparaty stosowane w celu oczyszczania kanałów, zbiorników wodnych itp., znalazła zastosowanie w testowaniu herbicydów.

Funderburk jun. i Lawrence (1963) stwierdzili wrażliwość rzęsy (*Lemna*) na diquat w stężeniu 0,005 ppm oraz paraquat — 0,0075 ppm. Efekt działania tych herbicydów ustalono przez określenie stopnia chlorozy w członach pędowych tej rośliny. Posługując się metodą tych autorów Parker (1965) wykonał podobne doświadczenia, potwierdzając prawidłowości wykazane przez poprzedników w odniesieniu do paraquatu i diquatu. Sutton i wsp. (1969), stosując w swoich badaniach takie rośliny jak *Elodea* i *Myriophyllum,* stwierdzili ich wysoką wrażliwość na simazynę w stężeniu od 0,12 do 1 ppm.

Blackburn i Weldon (1965) do testowania paraquatu i diquatu użyli następujących roślin: *Azolla caroliniana, Lemna minor, Spirodela polyrrhiza, Wolfiella floridana* i *Wolffia columbiana.* Wyniki odczytywano przez mierzenie zawartości chlorofilu w roślinach oraz przez szacunkową ocenę chlorozy. Badania te prowadzone były w celu stwierdzenia przydatności tych herbicydów w niszczeniu roślinności zarastającej zbiorniki wodne.

W ostatnich latach wielu badaczy (Damanakis 1970; Damanakis i wsp. 1970; Hance i wsp. 1968) stosowało test z rzęsą w celu oznaczenia pozostałości herbicydów w badaniach nad zjawiskiem adsorpcji szeregu preparatów przez glebę.

Test ten jest także obecnie stosowany w pracach A. Reislera (IBS — Wageningen).

MATERIAŁ I METODA

Wolffia arrhiza (L.) Wimm. — Wolffia bezłodygowa, jest to roślina z rodziny rzęsowatych. Ma postać kuleczek o średnicy 1-1,5 mm, bez korzeni i nerwów. W warunkach Polski nie rozmnaża się generatywnie. Występuje ona w wodach stojących na niżu, bardzo często razem z innymi roślinami rzęsowatymi. Autor czerpał materiał do pracy ze stawu znajdującego się w miejscowości Obory k. Warszawy.

Momentem, który zdecydował o wyborze tej rośliny do opracowania testu biologicznego, była jej forma i kształt. Poszczególne człony pędowe wolffii występują osobno, to znaczy nie są ze sobą połączone tak, jak to jest w przypadku rzęsy czy spirodeli. Wyjątek stanowią tu osobniki wytwarzające w danym momencie przyrosty. Zwykle po upływie 24-48 godzin następuje oddzielenie nowo przyrośniętego osobnika i proces przyrastania zaczyna się od nowa. Wszystkie człony pędowe są jednakowej

wielkości i barwy. Te fakty pozwoliły skierować uwagę na opracowanie metodyki biotestu opartej na liczeniu osobników żywych. W porównaniu z innymi kryteriami stosowanymi w biotestach, jak np. ocena stopnia chlorozy, ocena wielkości przyrostów biomasy czy długości łodyg lub korzeni, liczenie osobników wydaje się najbardziej obiektywną i niezawodną metodą. W przypadku bowiem ustalania czy roślina w danym stężeniu badanej substancji utrzymuje się przy życiu, nie wchodzi w rachubę błąd pomiaru czy oceny. Uzasadnienie wyboru wolffi opiera się na stwierdzonej przez autora wrażliwości tej rośliny na 2-metylotio-4,6-dwuizopropyloamino-1,3,5-triazynę (prometryna). W toku kilkudziesięciu analiz testowych ze znanymi stężeniami herbicydu ustalono graniczne rozcieńczenia, w których roślina reaguje zahamowaniem wzrostu i rozwoju oraz chlorozą i śmiercią. Wymagało to opracowania metodyki hodowli i testowania:

1. ustalenia składu pożywki do prowadzenia ciągłej hodowli rośliny w warunkach laboratoryjnych,
2. techniki wykonywania testu,
3. ustalenia metod otrzymywania wyników.

Metodyka testowania musiała być dostosowana do wymagań wolffii, która jest rośliną wodną.

Naczynie testowe stanowił tygiel o pojemności około 100 ml i średnicy 70 mm. Do naczyń tych wstawiane były zespoły 20 sztuk rurek szklanych o średnicy 5 mm i długości około 15 mm, w taki sposób, że górne ich krawędzie wystawały nieco ponad powierzchnię pożywki. Rurki te, mające dolne zakończenia uformowane w kształcie pipetek, nie dostawały do dna naczynia, były zaś oparte na 4 dłuższych rurkach, tworzących „nogi" urządzenia. Całość sklejona była żywicą epoksydową odporną na działanie chemikaliów i nie adsorbującą herbicydu.

W każdej z rureczek umieszczono po 1 członie pędowym wolffii, który pływając po powierzchni znajdował się w odległości 1-3 mm od górnej krawędzi rureczki. Kształt dolnego zakończenia rurek w formie pipety, podyktowany został obawą o wyczerpanie składników odżywczych pożywki w trakcie trwania testu. W związku z tym, istniała potrzeba wymiany pożywki we wszystkich rureczkach. W tym celu, codziennie unoszono cały zespół rurek, co powodowało wypływanie prawie całej pożywki z rurek i napływ nowej jej porcji, po opuszczeniu zespołu rurek.

Skład pożywki zestawiony przy uwzględnieniu składników zawartych w wodzie, w której w naturalnych warunkach żyje wolffia, przedstawia się następująco:

siarczan magnezu bezw.	137 mg/l
azotan amonu	2 mg/l
siarczan potasu	25 ml/l

fosforan I zas.	4 mg/l
chlorek wapnia	100 ml/l
żelazo helat.	6 mg/l

mikroelementy jak w pożywcze Hoaglanda.

Akwaria, z których pobierane były rośliny do testowania, ustawione były w pobliżu okna, ponadto oświetlane były dodatkowo przez 16 godzin na dobę światłem pochodzącym z lamp luminescencyjnych. Wymiana pożywki w akwariach dokonywana była co 2-4 tygodni. Zapewniało to nieprzerwany wzrost roślin w ciągu całego roku. Początkowe prace metodyczne dotyczyły doboru najodpowiedniejszej pożywki, naczyń i temperatury. W ich trakcie szczegółowo badano wrażliwość wolfii na prometrynę, w następujący sposób: odważoną ilość preparatu (100% substancja aktywna firmy CIBA-GEICY) rozpuszczano na gorąco w Tweenie 80 firmy LIGHT. Tę mieszaninę wprowadzano do wody destylowanej, również na gorąco. Pobranie z tej mieszaniny określonej ilości pozwalało na otrzymanie płynu o stężeniu 1 μg/ml wody (1 ppm). To stanowiło podstawę wykonania szeregu rozcieńczeń według skali geometrycznej z mnożnikiem 2, a więc przy mianowniku 2, 4, 8, 16, 32 itd. Każde następne naczynie w tym szeregu zawierało dwukrotnie mniejszą ilość herbicydu.

W tak przygotowanych naczyniach umieszczano po 20 sztuk roślin (w 4-5 powtórzeniach). Naczynia przenoszono do urządzenia, którym był przystosowany do powyższych celów kiełkownik Jacobsena. Urządzenie to stanowi pojemnik z wodą ogrzewaną grzałkami (temperatura regulowana jest systemem termometrów kontaktowych). Nad powierzchnią wody znajduje się podłoga z tafli szklanej, na której ustawione są naczynia testowe. Całość przykryta jest szybami, ponad którymi znajduje się rama ze świetlówkami (daylight) 40-watowymi. Czas oświetlania (16 godzin na dobę) regulowany jest zegarem elektrycznym.

Ideą opracowania testu, jak wspomniano, było stwierdzone zjawisko wpływu prometryny na tempo rozwoju i wzrostu wolffii. Większe stężenie tego preparatu wywołuje chlorozę i śmierć roślin. Dodać należy, że chloroza ta ma charakter nieodwracalny i prowadzi zawsze do śmierci rośliny. Na moment ten zwrócono szczególną uwagę, a ustalono go poprzez przenoszenie porażonych roślin do pożywki nie zawierającej preparatu.

Pomiar wpływu herbicydu na rośliny testowe polegał na liczeniu ich w odstępach 3-dniowych przez okres 2 tygodni. Po tym okresie rośliny po wyjęciu z naczyń i ich dokładnym powierzchniowym osuszeniu były ważone na wadze analitycznej, w celu określenia świeżej masy.

Umieszczenie każdej rośliny w osobnej rurce oraz pozostawienie w tym samym miejscu przez cały okres trwania testu dało możność dokładnego śledzenia poszczególnych etapów rozwojowych. Uzyskane wyniki

po zsumowaniu i wyciągnięciu średnich arytmetycznych, posłużyły do wykreślenia krzywych standardowych oraz do odczytania ilości prometryny (w przypadku testów z wyciągami glebowymi).

Końcowe prace nad testem z wolffią autor przeprowadził w Holandii w roku 1971. Warunki kontrolowane (fitotron) pozwoliły na szybkie i ostateczne ustalenie wrażliwości tej rośliny na prometrynę w porównaniu ze stosowaną w IBS * rzęsą *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schleiden.

Metodyka tych prac nie odbiegała zbytnio od stosowanej w kraju i przedstawiała się następująco:

Rośliny na 3 dni przed rozpoczęciem testu, przeniesione były ze szklarni, gdzie rosły w akwariach, do komory w fitotronie (dla zaaklimatyzowania się w stałych warunkach temperatury, oświetlenia, wilgotności powietrza). Następnie przemywane były wodą bieżącą, co zapobiegało rozwojowi glonów.

Do sporządzania roztworów, w których umieszczono rośliny, używano stężonej pożywki wg van der Veij. Skład pożywki:

Mikroelementy:

H_3BO_3	2,86 g	w 1 litrze H_2O
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,03 g	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 g	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,02 g	

Makroelementy:

$Ca(NO_3)_2$	16,41 g	rozp. w 100 ml H_2O	— 80 ml
KNO_3	10,11 g	„ „ „ „	— 20 ml
KH_2PO_4	6,804 g	„ „ „ „	— 40 ml
NaCl	5,845 g	„ „ „ „	— 20 ml
$MgSO_4$	6,019 g	„ „ „ „	— 40 ml
		Razem	200 ml

Sporządzenie pożywki wymaga zrobienia wyciągu wodnego z torfu wysokiego. Do 0,3 litra torfu należy dodać 1 litr wrzącej wody, a po 12 godzinach mieszaninę odsączyć. Do 500 ml przesączu dodajemy 10 ml mikroelementów (gdzie uprzednio wszystkie składniki rozpuszczono w 1000 ml H_2O), 200 ml roztworu makroelementów, dopełniamy wodą do 1000 ml (A). Tak przygotowaną pożywkę można przetrzymywać przez okres kilku miesięcy w niskiej temperaturze.

Roztwór żelaza sporządzamy następująco: w 104 ml 1 N KOH rozpuszczamy 32,88 g kwasu wersenowego, dodajemy 24,8 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, dopełniamy wodą do 1000 ml (B). Roztwór poddajemy napowietrzaniu (używając np. pompki do akwarium) przez 12 godzin, w ciemności.

Sporządzając roztwory testowe, dodajemy 2 ml skoncentrowanej po-

---

* Instytut voor Biologisch en Scheikundig Onderzcek bij Landbaumgewassen te Wageningen.

żywki (A) 1 ml roztworu żelaza, gdzie uprzednio 40 ml roztworu (B) mieszamy z 960 ml wody.

Podane ilości dotyczą przypadku, gdzie ostateczna ilość płynu w naczyniu testowym wynosi 100 ml.

Do każdego z naczyń wkładano po ± 3 egzemplarze rzęsy — co stanowiło 5-8 członów pędowych, a do innych naczyń tej samej serii po około 150 sztuk członów pędowych wolffii.

Rośliny przeznaczone do poszczególnych naczyń przed ich umieszczeniem w roztworach, ważone były na wadze analitycznej, a różnice między nimi nie przekraczały nigdy 1 miligrama, co pozwoliło w rezultacie na określenie z dużą dokładnością efektu toksyczności herbicydu również przez ważenie.

Cała procedura w praktyce przebiegała z dokładnością rzędu sekund dla poszczególnych operacji, przy czym szczególnie starannie przestrzegano dokładności w czasie przebywania roślin poza ich naturalnym środowiskiem.

Naczynia testowe umieszczone zostały na obrotowym stole (6 obrotów na minutę), zapewniającym równomierność oświetlenia. Przez cały okres wzrostu roślin testowych w fitotronie (jeden tydzień) temperatura wynosiła 22°C, wilgotność względna powietrza 80%. Oświetlenie stanowiły lampy luminescencyjne i żarowe, które włączone były przez 14 godzin na dobę. Ubytki wody z naczyń wskutek parowania i transpiracji roślin uzupełniane były codziennie.

Po upływie 1 tygodnia rośliny wyjęto z naczyń i po wysuszeniu w suszarce (w temperaturze 60°C przez 24 godziny) zważono na wadze analitycznej z dokładnością do 0,5 mg.

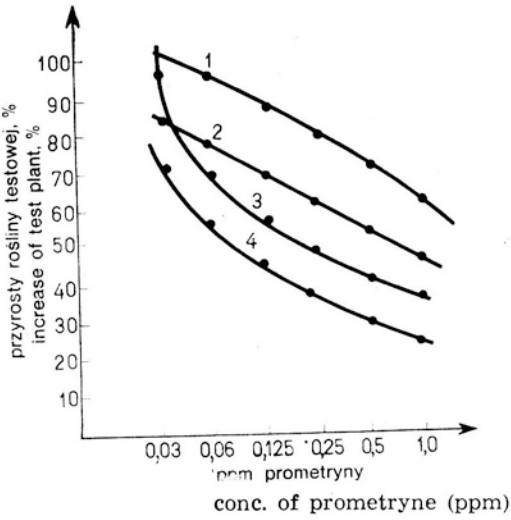
WYNIKI

Rysunek 1 przedstawia wykres obrazujący wzrost liczby członów pędowych wolffii. Dane uzyskano przez obliczenie przyrostów w odstępach trzydniowych, rozpoczynając liczenie 8 dnia od założenia testu. Każde z rozcieńczeń (mianownik 2) zawierało po 4 naczynia z 20 roślinami (liczba początkowa).

Poszczególne krzywe powstały z połączenia punktów, które charakteryzują wzrost wolfii w roztworze o określonym stężeniu, w serii standardowej w danym dniu trwania testu. Wyrażają one liczbę egzemplarzy roślin w procentach, gdzie za 100 przyjęto liczbę członów pędowych tej rośliny w naczyniach nie zawierających herbicydu (kontrolnych).

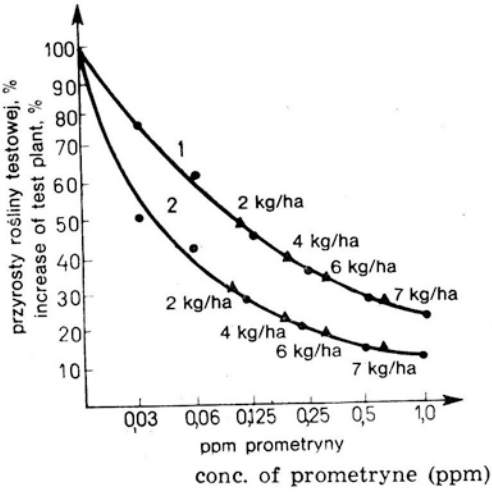
Chodziło tu o przedstawienie dynamiki wzrostu rośliny w poszczególnych stężeniach serii standardowej od 8 do 17 dnia trwania testu.

Praktyczne znaczenie ma jedynie krzywa wyrażająca wzrost wolffii po 17 dniach od rozpoczęcia testu.



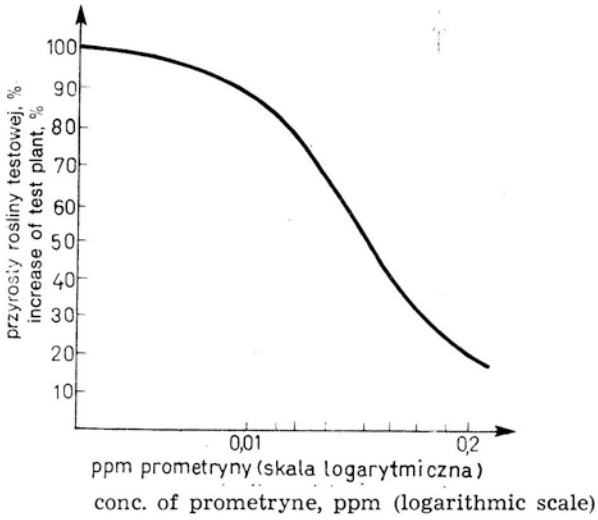
Rys. 1. Przyrosty wolffii w serii standardowej obliczone w % przyrostu kontroli po 8, 11, 14 i 17 dniach od rozpoczęcia testu
1 — 8 dni; 2 — 11 dni; 3 — 14 dni; 4 — 17 dni

Fig. 1. Growth of *Wolffia arrhiza* in a standard series as % of control after 8, 11, 14, and 17 days from the beginning of the test
1 — 8 days; 2 — 11 days; 3 — 14 days; 4 — 17 days

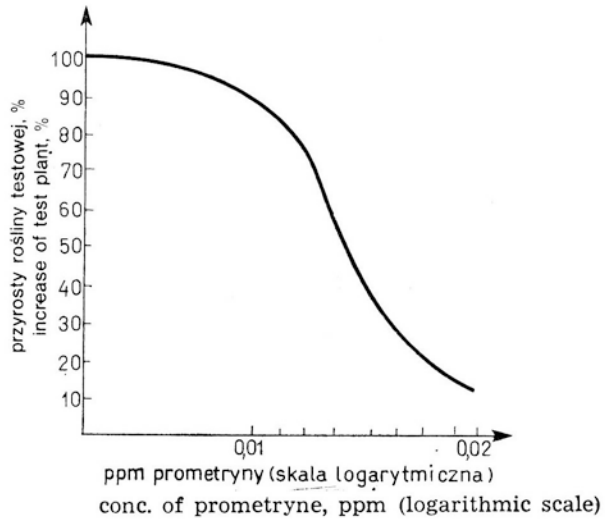


Rys. 2. Krzywe standardowe reakcji wolffii na prometrynę (liczba roślin i świeża masa) wyrażonej procentami wzrostu rośliny testowej w badanych roztworach (z nieznanymi ilościami herbicydu)
1 — liczba roślin; 2 — masa roślin

Fig. 2. Standard curves of the reaction of *Wolffia arrhiza* to prometryne (number of plants and fresh weight) expressed as percent of growth of the test plant in the examined solutions (with unknown amounts of herbicide)
1 — number of plants; 2 — weight of plants



Rys. 3. Krzywa standardowa reakcji wolffii na prometrynę (masa roślin)
Fig. 3. Standard curve of reaction of *Wolffia arrhiza* to prometryne (plant mass)



Rys. 4. Krzywa standardowa reakcji spirodeli na prometrynę (masa roślin)
Fig. 4. Standard curve of reaction of *Spirodella* to prometryne (plant mass)

W trakcie doświadczeń, powtórzonych kilkadziesiąt razy, stwierdzono ścisłą zależność pomiędzy liczbą członów pędowych rośliny a ich ciężarem. Uwidacznia to rysunek 2, gdzie w ten sam sposób jak powyżej naniesiono na układ współrzędnych dane dotyczące liczby oraz ciężaru świeżej masy roślin. Charakterystyczną cechą wykresu jest to, że krzywa

obrazująca ciężar roślin znajduje się zawsze poniżej krzywej dotyczącej ich liczby. Mamy tu do czynienia ze zjawiskiem stopniowego zmniejszania się ciężaru poszczególnych roślin w miarę wzrostu stężenia herbicydu i czasu jego toksycznego oddziaływania na organizm roślinny.

Punkty w formie trójkątów, zaznaczone na obu krzywych stanowią przykład praktycznego oznaczania stężenia herbicydu w badanych roztworach. Zawierały one nieznane ilości preparatu (prometryny) i były ekstraktami wodnymi gleby torfowej uprzednio potraktowanej herbicydem. Dawki prometryny w przeliczeniu na 1 ha wynosiły 2, 4, 6 i 7 kg (substancji aktywnej). Oznaczenia wykonano na próbkach z poletek po 6 tygodniach od potraktowania gleby herbicydem. Powyższe trójkąty, wyznaczają liczbę (górna krzywa) i ciężar świeżej masy roślin (dolna krzywa) w badanych roztworach, wyrażonych procentami liczby i ciężaru roślin w naczyniach kontrolnych serii standardowej. Widzimy, że istnieje tu tylko niewielkie przesunięcie w kierunku poziomym trójkątów odnoszących się do poszczególnych obiektów (kg prometryny na 1 ha). Stąd rzutowanie tych punktów na oś „x", daje nieznaczną tylko różnicę odczytu ppm preparatu z pierwszej lub drugiej krzywej. Ta zgodność odczytów świadczy o adekwatności toksycznego oddziaływania herbicydu na tempo przyrastania nowych członów pędowych wolffii, jak i na ich ciężar.

Rysunki 3 i 4 przedstawiają krzywe standardowe obrazujące toksyczność prometryny, gdzie obok wolffii (rys. 3) rośliną testową była rzęsa — *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden (rys. 4). Wykresy te powstały przez naniesienie na układ współrzędnych ciężaru suchej masy roślin w każdym z rozcieńczeń herbicydu wyrażonej w procentach kontroli. Inny nieco jest tu zakres stężeń herbicydu oraz mnożnik, według którego przygotowano poszczególne rozcieńczenia. Wynosi on tu 1,5, a stężeniem wyjściowym jest 0.01 ppm prometryny.

WNIOSKI

W latach 1967-1971 opracowano metodę analizy testowej (test biologiczny) z rośliną wodną *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm.

1. Stwierdzono przydatność rośliny wodnej *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm, (wolffia bezłodygowa) hodowanej w warunkach laboratoryjnych, do ilościowego oznaczania pozostałości herbicydu — prometryny.

2. Najmniejsza dająca się oznaczyć ilość tego preparatu wynosi 0,01 μg/ml (0.01 ppm). Kryteriami oceny może być liczenie roślin lub ustalenie ich ciężaru.

3. Stwierdzono istnienie zgodności wyników przy ilościowym oznaczaniu pozostałości prometryny, zarówno gdy rośliną testową była *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm, jak i *Spirodela polyrrhiza* (L.) Scheiden (spirodela wielokorzeniowa).

SUMMARY

In the years 1967-1971 experiments were performed on the sensitivity of the water plant *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. to the herbicide 2-methylmercapto-4,6-diisopropylamino-1,3,5-triasine (prometryne).

As a result of the work it was determined that prometryne causes chlorosis and death of the plants starting from a 0.01 ppm concentration. This made possible the elaboration of a test method of this herbicide where the countaing and weighing of the plants may serve as a criterion.

A laboratory culture method of *Wolffia* was elaborated.

Spirodela polyrrhiza (L.) Schleiden was found to have a similar degree of sensitivity to prometryne as *Wolffia*.

LITERATURA

Addison A. A., Bardsley C. E., 1968. *Chrolella vulgaris* assay of the activity of soil herbicides, Weed Science, 16 (4). 427-429.

Blackburn R. D., Weldon L. W., 1965. The sensitivity of duckweed (*Lemnaceae*) and *Azolla* to diquat and paraquat, Weeds, 13 (2): 147-149.

Damanakis M., 1970. A bioassay for the determination of low concentration of paraguat, Weed Research, 10 (1): 77-80.

Demanakis M., Drennan D. S. H., Freyer J. D., Holly K., 1970. The adsorption and mobility of paraquat on different soils and soil constituents, Weed Research, 10 (3): 264-277.

Funderburk jun. H. H., Lawrence J. M., 1963. A sensitive method for determination of low concentration of diquat and paraquat, Nature 199, (4897): 1011-1012.

Hance R. J., Hocombe S. D., Holroyd J., 1968. The phytotoxicity of some herbicides in field and pot experiment in relation to soil properties, Weed Research, 8 (2): 136-144.

Kamiński A., 1964. Zastosowanie wskaźników przyrostu reakcji i trwałości działania do testowego rozpoznawania trucizn owadobójczych w ilościach śladowych. Zesz. prob. Post. Nauk rol. 51: 141-145.

Kamiński A., 1965, Biologiczna analiza testowa śladowych ilości trucizn esterazy cholinowej na hodowanych skorupiakach wodnych (*Asellus, Daphnia*). Rocz. Wojs. Ins. Hig. 2 (3): 19-49.

Kamiński A., Zawadzki B., Szymańska T., 1969. Wpływ gleby torfowej na aktywność gamma sześciochlorocykloheksanu (HCH), Rocz. Nauk rol. Ser. A, 95 (4): 589-605.

Parker C., 1965. A rapid bioassay method for the detection of herbicides which inhibit photosynthesis, Weed Research, 5 (2): 181-184.

Sutton D. L., Durham D. A., Bingham S. W., Foy C. L., 1969. Influence of simazine on apparent photosynthesis of aquatic plants and herbicide residue removal from water, Weed Science, 17 (1): 56-59.

(Przyjęto dn. 31.3.1974)