



Otrzymano: 22 maja 2016  
Zaakceptowano: 13 czerwca 2016  
Udostępniono online: 17 czerwca 2016

# Inhibicja wzrostu i stres oksydacyjny w roślinach pod wpływem chiralnej imidazoliowej cieczy jonowej z anionem tetrafluoroboranowym

## Growth inhibition and oxidative stress in plants under the influence of chiral imidazolium ionic liquid with tetrafluoroborate anion

Robert BICZAK,<sup>1,\*</sup> Barbara PAWŁOWSKA,<sup>1</sup> Joanna FEDER-KUBIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biochemii i Ekotoksykologii, Akademia im. J. Długosza w Częstochowie, 42-200 Częstochowa, Armii Krajowej 13/15, Polska;

<sup>2</sup> Zakład Inżynierii Chemicznej, Politechnika Wrocławska, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, Polska

**Streszczenie:** Ciecze jonowe to związki chemiczne, które dzięki swoim pożądanym właściwościom budzą duże zainteresowanie wśród naukowców i przedstawicieli przemysłu. Skutkuje to komercyjnym stosowaniem tych związków, co z kolei na pewno doprowadzi do skażenia nimi gleb stanowiących podstawę wegetacji roślin. W niniejszej pracy określono oddziaływanie chiralnej imidazoliowej cieczy jonowej (CIL), zawierającej naturalny komponent terpenowy – mentol – mianowicie: tetrafluoroboranu 3-[1*R*,2*S*,5*R*-(-)-mentoksymetylo]-1-metyloimidazoliowego [Im-Men][BF<sub>4</sub>] na wzrost oraz rozwój siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. Zastosowana CIL charakteryzowała się toksycznością dla obu roślin, co przejawiało się skracaniem długości części nadziemnych roślin, ich korzeni oraz spadkiem plonu świeżej masy. Użyty w eksperymencie wazonowym [Im-Men][BF<sub>4</sub>] prowadził ponadto do spadku zawartości wszystkich barwników asymilacyjnych w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej, co znalazło odzwierciedlenie we wspomnianym już spadku plonu. Ponadto, zmiany zawartości dialdehydu malonowego (MDA) i nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich, jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza (POD) świadczą o występowaniu stresu oksydacyjnego w obu roślinach.

**Słowa kluczowe:** chiralne ciecze jonowe; fitotoksyczność; inhibicja wzrostu; barwniki asymilacyjne; stres oksydacyjny

**Abstract:** Ionic liquids (ILs) constitute a large group of chemical substances, which, thanks to their desirable properties, still attract attention of scientists and representatives of industry. This results in commercial use of these compounds, what will doubtlessly lead to soil contamination with these substances and formation of soil – the basis of plant vegetation. The present paper researches the influence of chiral imidazolium ionic liquid (CIL), containing a natural component of the terpene – menthol: 3-[1*R*,2*S*,5*R*-(-)-menthoxyethyl]-1-methylimidazolium tetrafluoroborate [Im-Men][BF<sub>4</sub>] on the growth and the development of spring barley and common radish. The used CIL was toxic for both plants, what resulted in shortening of the plant stem and root length and decrease in fresh weight yield. [Im-Men][BF<sub>4</sub>] used in the pot experiment led to a decrease of all photosynthetic pigments content in spring barley seedlings and common radish leaves, what reflected on the mentioned yield level. Furthermore, changes in contents of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the activity of antioxidant enzymes, *i.e.* superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) may indicate the occurrence of oxidative stress in both plants.

**Keywords:** chiral ionic liquids; phytotoxicity; growth inhibition; photosynthetic pigments; oxidative stress

### 1. Wstęp

Reaktywne formy tlenu (RFT) to niskocząsteczkowe związki chemiczne, wytwarzane naturalnie i ciągle w procesach metabolicznych przez wiele organelli komórkowych roślin. Powstają one jako produkty uboczne w procesie fotosyntezy, w łańcuchu oddechowym oraz w reakcjach chemicznych związanych z utlenianiem substratów. Reaktywne formy tlenu takie, jak anionorodnik ponadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), tlen singletowy (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), czy rodnik hydroksylowy (OH<sup>•</sup>) są substancjami charakterystycznymi dla normalnego

metabolizmu roślin. Występując w niskich stężeniach pełnią bardzo ważną funkcję sygnalizacyjną, wykorzystywaną w regulacji wielu procesów fizjologicznych, takich jak: reakcje odpornościowe roślin, geotropizm, działanie fitohormonów, wzrost liści czy rozwój kwiatów, kiełkowanie nasion, czy wreszcie sygnalizacja śmierci komórki. Dlatego, niektórzy badacze uważają, że zamiast określenia „stres oksydacyjny” należy używać sformułowania „sygnalizacja oksydacyjna”. O stresie oksydacyjnym mówimy zaś wówczas, kiedy w roślinach następuje nadprodukcja wolnych rodników tlenowych i występują one w komórkach w znacznych ilościach. Taki stan rzeczy może skutkować bardzo poważnymi konsekwencjami dla roślin, ponieważ wszystkie RFT prowadzą do peroksydacji lipidów w błonach komórkowych, uszkodzenia DNA,

\* Autor korespondencyjny.  
Adres e-mail: [r.biczak@ajd.czyst.pl](mailto:r.biczak@ajd.czyst.pl) (R. Biczak).

białek, węglowodanów, barwników asymilacyjnych oraz mogą prowadzić do upośledzenia aktywności enzymatycznych, co skutkuje przedwczesnym starzeniem się roślin, a w skrajnych wypadkach ich śmiercią [1–5].

W związku z powyższym, podstawowym zadaniem dla organizmów roślinnych jest utrzymanie stężenia RFT na zrównoważonym poziomie. Rośliny, będąc organizmami osiadłymi, nie mogą unikać czynników stresogennych, musiały więc w drodze ewolucji wykształcić w miarę doskonały system obrony przed RFT. Do pierwszej linii obrony przed szkodliwym działaniem RFT zalicza się nieenzymatyczne przeciwutleniające. Są to niskocząsteczkowe substancje chemiczne, takie jak: zredukowany glutation, tokoferol, karotenoidy, flawonoidy oraz kwas askorbinowy. Drugą linię obrony przed RFT stanowią wysoce specjalistyczny system enzymatyczny, składający się z takich enzymów, jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza askorbinianowa (APX) i gwajakolowa (GPX) czy reduktaza glutationowa (GR) i dehydroaskorbinianowa (DHAR) [2,4,6–8].

Łądowe rośliny wyższe, w ciągu całego okresu wegetacji są ciągle narażone na szereg abiotycznych i biotycznych czynników środowiskowych, powodujących powstawanie stresu oksydacyjnego w komórkach. W badaniach naukowych bardzo często dowodzi się, że znaczny wzrost stężenia RFT następuje w roślinach poddanych stresowi związanemu z zasoleniem [2,8–10], suszą [4,6], niskimi temperaturami [3], zanieczyszczeniem gleb metalami ciężkimi [7,11] i glinem [11,12] oddziaływaniem herbicydów [13], fumigacją ozonem [14], czy w końcu atakiem patogenów [15].

Coraz częściej do czynników abiotycznych powodujących występowanie stresu oksydacyjnego w roślinach, zalicza się czwartorzędowe sole amoniowe (CSA), w tym cieczce jonowe (ILs). ILs to jedne z najbardziej obiecujących i uniwersalnych związków chemicznych ostatnich dekad, charakteryzują się budową jonową oraz tym, że w szerokim zakresie temperatur mogą być zarówno cieczkami, jak i ciałami stałymi. Olbrzymie zainteresowanie cieczkami jonowymi wynika z ich wielu pożądanych właściwości takich, jak nieznaczna prężność par, polarność, wysoka termiczna i elektrochemiczna stabilność, duże przewodnictwo jonowe, niepalność oraz dobre właściwości katalityczne. Jednak najważniejszą cechą tych związków chemicznych jest możliwość uzyskiwania założonych teoretycznie właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych, poprzez dobór odpowiedniego kationu, wymianę anionu lub zmieszanie 2 lub 3 cieczy jonowych. Stąd w literaturze bardzo często cieczce jonowe opisywane są jako „rozpuszczalniki projektowane”. Powyższe cechy cieczy jonowych pozwoliły na uznanie ich za doskonałe zamienniki dla lotnych organicznych rozpuszczalników i wykorzystanie w procesach biokatalizy, analityce chemicznej, separacji i ekstrakcji, elektrochemii, a także w przemyśle farmaceutycznym i biotechnologii. Cieczone jonowe są z powodzeniem stosowane także w nanotechnologii oraz jako superkondensatory, elektrolity w bateriach i substancje zwiększające odporność metali na korozję [16–19].

Cieczone jonowe, podobnie jak wszystkie związki chemiczne, mogą trafić do środowiska glebowego, gdzie zostaną zatrzymane przez koloidy glebowe lub będą występować w roztworze glebowym. Stamtąd są pobierane przez rośliny, wpływając tym samym na ich wzrost i rozwój, a także wielkość i jakość plonu. Dlatego w dostępnej literaturze pojawiają się coraz częściej doniesienia opisujące wpływ ILs na łądowe rośliny

wyższe [20–24]. W wymienionych pracach stopień oddziaływania ILs na łądowe rośliny wyższe został określony na podstawie wzrostu roślin, poziomu świeżej i suchej masy oraz ich wyglądu zewnętrznego, natomiast jak podaje Cvjetko Bubalo i wsp. [24] sam mechanizm toksyczności ILs nie został jeszcze w pełni zrozumiany. Dlatego w ostatnich kilku latach w literaturze naukowej prezentowany jest pogląd, że cieczce jonowe wywołują u badanych organizmów stres oksydacyjny [25–30].

Mając na uwadze wyniki cytowanych badań, w niniejszej pracy podjęto próbę określenia inhibicji wzrostu roślin i oszacowania wielkości stresu oksydacyjnego w jęczmieniu jarym i rzodkiewce zwyczajnej uprawianych na glebie z dodatkiem tetrafluoroboranu 3-[1*R*,2*S*,5*R*(–)-mentoksymetylo]-1-metyloimidazoliowego [Im-Men][BF<sub>4</sub>]. Ta chiralna ciecz jonowa zawiera w swoim składzie naturalny surowiec – mentol, alkohol terpenowy posiadający charakterystyczny miętowy zapach. Mentol to nietoksyczny i tani materiał, często wykorzystywany do produkcji m.in. farmaceutyków. Dlatego interesującym wydaje się być określenie fitotoksyczności cieczy jonowych zawierających ten alkohol terpenowy, tym bardziej, że we wcześniejszych pracach [31–34] opisano już właściwości antytatyczne i wykorzystanie CILs z mentolem w katalizie organicznej oraz stabilizacji i aktywowaniu lakazy. Wybór do badań CIL zawierającej anion tetrafluoroboranowy podyktowany był także doniesieniami w literaturze o wysokiej toksyczności tych anionów z uwagi na fakt, że w wyniku ich hydrolizy powstaje toksyczny i wysoce niepożądany w środowisku naturalnym jon fluorkowy. Telesiński i Śnioszek [35] stwierdzili, że oddziaływanie fluoru na rośliny dotyczy m.in. ujemnego wpływu tego pierwiastka na procesy asymilacji i fotosyntezy, co w konsekwencji prowadzi do hamowania wzrostu rośliny itp. Zjawiska te wynikają z destrukcyjnego wpływu fluoru na chloroplasty. Celem przeprowadzenia powyższych badań było ponadto porównanie oddziaływania [Im-Men][BF<sub>4</sub>] na rośliny jedno- i dwuliścienne, co może stanowić podstawę do wyboru takich gatunków roślin, które na glebach skażonych ILs będą lepiej radzić sobie ze stresem oksydacyjnym, dając jednocześnie oczekiwanej wielkości i wymaganej jakości plony. Jęczmień jary to bowiem czwarte zboże na świecie, zarówno pod względem produkcji, jak i obszaru uprawy, mające olbrzymie znaczenie z punktu widzenia gospodarki i żywienia człowieka. Rzdokiewka zwyczajna jest natomiast bardzo popularnym warzywem, uzupełniającym dietę człowieka w szereg makro- i mikroelementów oraz witamin [1,36,37].

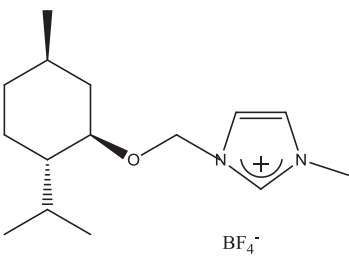
## 2. Część eksperymentalna

### 2.1. Chiralna ciecz jonowa

Będąca przedmiotem badań chiralna ciecz jonowa – tetrafluoroboran 3-[1*R*,2*S*,5*R*(–)-mentoksymetylo]-1-metyloimidazoliowy [Im-Men][BF<sub>4</sub>] została zsyntezowana w Zakładzie Inżynierii Chemicznej Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej. Szczegółowa metodyka otrzymywania tej hydrofobowej soli została opisana w pracy Pernak i wsp. [34]. Strukturę związku, wydajność reakcji oraz zawartość środka powierzchniowo czynnego zaprezentowano w Tabeli 1.

Struktura [Im-Men][BF<sub>4</sub>] została potwierdzona za pomocą <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR (Bruker DRX z tetrametylosilanem jako standardem, przy 600 MHz i 75 MHz). Analiza elementarna

**Tabela 1.** Struktura i właściwości tetrafluoroboranu 3-[1*R*,2*S*,5*R*(-)-mentoksymetylo]-1-metyloimidazoliowego.

Skrót	Struktura	Wydajność reakcji %	Zawartość środka powierzchniowo czynnego %
[Im-Men][BF <sub>4</sub> ]		99.0	98.5

otrzymanej soli: tetrafluoroboran 3-[1*R*,2*S*,5*R*(-)-mentoksymetylo]-1-metyloimidazoliowy – obliczono (%) dla C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O (338.24). C 53.26, H 8.06, N 8.28; znaleziono: C 53.33, H 8.17, N 8.22.

## 2.2. Warunki prowadzenia eksperymentu wazonowego

Badania dotyczące określenia fitotoksyczności [Im-Men][BF<sub>4</sub>] zostały przeprowadzone w Zakładzie Biochemii i Ekotoksykologii Akademii im. J. Długosza w Częstochowie w oparciu o przewodnik OECD/OCDE 208/2006 [38]. W eksperymencie wazonowym wykorzystano roślinę jednoliścienną – jęczmień jary (*Hordeum vulgare*) i roślinę dwuliścienną – rzodkiewkę zwyczajną (*Raphanus sativus* L. subvar. *radicula* Pers.). Doniczki o średnicy 90 mm, napełniono glebą kontrolną i glebą z dodatkiem [Im-Men][BF<sub>4</sub>]. W tym celu tetrafluoroboran [1*R*,2*S*,5*R*(-)-mentoksymetylo]-1-metyloimidazoliowy rozpuszczono w acetonie i zmieszano z piaskiem kwarcowym. Po napowietrznym odparowaniu acetonu piasek kwarcowy z [Im-Men][BF<sub>4</sub>] dokładnie wymieszano z glebą. Do kontroli dodano piasek kwarcowy bez zawartości CIL. W omawianym eksperymencie [Im-Men][BF<sub>4</sub>] zastosowano w stężeniach 0, 1, 10, 50, 100, 400, 700 i 1000 mg/kg suchej masy gleby. Analiza składu granulometrycznego gleby wykazała, że był to piasek gliniasty, o około 11% zawartości frakcji o średnicy < 0.02 mm, węgla organicznego – 8.5 g·kg<sup>-1</sup> i pH(KCl) równym 5.9. Do tak przygotowanych wazonów wysiano po 20 jednakowych i pochodzących z tego samego źródła nasion wybranych gatunków roślin. Przez cały okres prowadzenia badań (14 dni) utrzymywano stałą wilgotność podłoża (70% ppw), stałą temperaturę 20°C ±2°C i stałe oświetlenie na poziomie 170 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> w systemie 16 h dzień/8 h noc.

Jako wskaźnik toksyczności [Im-Men][BF<sub>4</sub>] posłużyło określenie plonu świeżej masy roślin oraz zahamowanie wzrostu ich korzeni i części nadziemnych. Długość części nadziemnych i korzeni była mierzona w sposób opisany przez Wang i wsp. [39]. Współczynnik inhibicji obliczono jako (długość/masa w grupie kontrolnej) / (długość/masa w grupie traktowanej [Im-Men][BF<sub>4</sub>]) / (długość/masa w grupie kontrolnej) × 100%. Wyniki wyrażono jako % inhibicji plonu świeżej masy, długości części nadziemnych i długości korzeni w porównaniu do kontroli oraz obliczono EC<sub>50</sub>. Skuteczne stężenia (EC<sub>50</sub>) oszacowano za pomocą analizy regresji nieliniowej, korzystając z oprogramowania GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

W świeżym materiale roślinnym określono ponadto zawartość wszystkich barwników asymilacyjnych, dialdehydu malo-

nowego i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy. Obiekty, na których zastosowano wysokie stężenia CIL, nie zostały uwzględnione w niektórych analizach, ponieważ inhibicja wzrostu części nadziemnych jęczmienia jarego i rzodkiewki była tak duża, że nie udało się zebrać materiału roślinnego do badań.

## 2.3. Oznaczanie zawartości barwników asymilacyjnych

Zawartość barwników fotosyntetycznych oznaczano metodą spektroskopową zgodnie ze sposobem opisanym przez Oren i wsp. [40]. W tym celu naważkę (0.2 g) świeżej masy liści homogenizowano z dodatkiem 80% roztworu acetonu schłodzonego do temp. 4°C, następnie odwirowano, a przesącz uzupełniono do stałej objętości 25 cm<sup>3</sup>. Zawartość chlorofilu *a*, chlorofilu *b* i karotenoidów, oznaczono poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 470 nm, 647 nm i 664 nm. Zawartość pigmentów fotosyntetycznych wyrażoną w mg·g<sup>-1</sup> świeżej masy (św.m.) obliczono z następujących wzorów:

$$a = 11.78 \cdot A_{664} - 2.29 \cdot A_{647} \quad (1)$$

$$b = 20.05 \cdot A_{647} - 4.77 \cdot A_{664} \quad (2)$$

$$c = 1000 \cdot A_{470} - 3.27 \cdot a - 104 \cdot b \quad (3)$$

$$chl\ a = 25 \cdot \left(\frac{a}{m}\right) \quad (4)$$

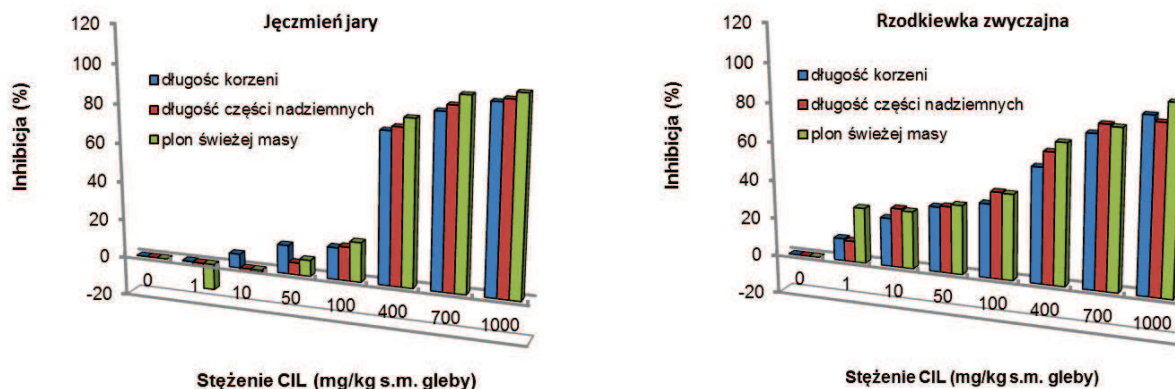
$$chl\ b = 25 \cdot \left(\frac{b}{m}\right) \quad (5)$$

$$kar = \left(\frac{25 \cdot c}{229 \cdot m}\right) \quad (6)$$

gdzie *m* – ilość świeżej masy materiału roślinnego [mg].

## 2.4. Oznaczanie zawartości dialdehydu malonowego (MDA) i nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Naważkę (0.5 g) świeżej masy liści homogenizowano z dodatkiem schłodzonego (4°C) 0.1% roztworu kwasu trichlorooctowego, a po odwirowaniu uzyskany supernatant posłużył do oznaczenia zawartości MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zawartość dialdehydu malonowego określono zgodnie z metodą opisaną przez Hodges i wsp. [41], wykorzystując jako substrat kwas tiobarbiturowy. Zawartość MDA oznaczono poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 532 nm i 600 nm, następnie obliczono, wykorzystując współczynnik ekstynkcji równy 155 nm<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, i wyrażono w μmol·g<sup>-1</sup> św.m. Dla określenia zawartości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zmierzono absorbancję przy długości fali 390 nm mieszaniny reakcyjnej składającej się z supernatantu, bu-



**Rysunek 1.** Inhibicja długości części nadziemnych roślin i ich korzeni oraz plonu świeżej masy jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej.

foru fosforanowego o pH – 7.0 i jodku potasu [42]. Zawartość  $H_2O_2$  obliczono, wykorzystując współczynnik ekstynkcji równy  $155 \text{ nm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , i wyrażono w  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{św.m.}$

#### 2.5. Określenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy

Naważkę (0.5 g) świeżej masy liści zhomogenizowano z dodatkiem schłodzonej ( $4^\circ\text{C}$ ) mieszaniny ekstrakcyjnej zawierającej bufor fosforanowy o pH = 7.4, 1 mM roztwór EDTA i 0.1% roztwór poliwinylpiperolidonu (PVP). Po odwirowaniu uzyskany supernatant posłużył do oznaczenia aktywności badanych enzymów i zawartości białka.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) [EC 1.15.1.1] oznaczono spektrofotometrycznie poprzez pomiar stopnia redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) przez anionorodnik ponadtlenkowy powstały w wyniku fotochemicznej redukcji ryboflawiny na świetle [43]. Forma utleniona NBT (barwa żółta) ulega redukcji przez  $O_2$  do formy diformazanowej (barwa fioletowa). Reakcja redukcji NBT hamowana jest przez SOD. Określając aktywność SOD, zmierzono absorbcję mieszaniny reakcyjnej przy długości fali 560 nm. Aktywność SOD wyrażono w jednostkach aktywności –  $U \cdot \text{mg}^{-1}$  białka. 1 [U] – jednostka aktywności, określa taką ilość enzymu która powoduje 50% inhibicję reakcji redukcji NBT.

Aktywność katalazy (CAT) [EC 1.11.1.6] oznaczono miareczkowo, wykorzystując metodę Kar i Mishra [44]. Aktywność CAT została określona przez rozkład  $H_2O_2$  w czasie 15 min. Pozostały  $H_2O_2$  odmiareczkowano 0.01 N roztworem  $KMnO_4$ , aż do uzyskania słabo fioletowego zabarwienia utrzymującego się przez co najmniej 15 sekund. Aktywność katalazy wyrażono jako  $U \cdot \text{mg}^{-1}$  białka  $\cdot \text{min}^{-1}$ .

Aktywność peroksydazy (POD) [EC 1.11.1.7] oznaczono spektrofotometrycznie (pomiar absorbcji przy długości fali 470 nm) poprzez określenie szybkości utleniania gwajakolu w obecności  $H_2O_2$  przez enzym zawarty w określonej objętości próbki w czasie 1 min [45]. Aktywność peroksydazy wyrażono jako  $U \cdot \text{mg}^{-1}$  białka  $\cdot \text{min}^{-1}$ .

Zawartość białka ogółem, potrzebną do przeliczenia aktywności enzymatycznej SOD, CAT i POD określono metodą Bradforda [46].

#### 2.6. Analiza statystyczna

Wszystkie otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Do określenia istotności stwierdzonych różnic wy-

korzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a wartości NIR przy poziomie istotności  $p < 0.05$  obliczono testem Tukey'a. Prezentowane w tabelach i na rysunkach dane są średnią  $\pm$  odchylenie standardowe z 3 powtórzeń wykonanych analiz dla każdego stężenia związku. W pracy przedstawiono również korelacje pomiędzy aktywnością POD, a zawartością chlorofilu całkowitego w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej uprawianych na glebie z dodatkiem [Im-Men][BF<sub>4</sub>].

### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1. Inhibicja wzrostu roślin

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu wazonowego okazało się, że tetrafluoroboran 3-[1*R*,2*S*,5*R*-(–)-mentoksymetylo]-1-metyloimidazoliowy [Im-Men][BF<sub>4</sub>] jest substancją toksyczną dla jęczmienia jarego. Świadczy o tym wzrastająca inhibicja długości korzeni, części nadziemnych oraz plonu świeżej masy tej rośliny, skorelowana ze zwiększaniem się stężenia CIL w glebie (Rysunek 1). Wyliczone wartości  $EC_{50}$  wynosiły 218 mg, 227 mg i 177 mg/kg gleby, odpowiednio dla inhibicji długości korzeni, długości części nadziemnych i świeżej masy jęczmienia jarego. Rzodkiewka zwyczajna okazała się natomiast rośliną o nieco wyższej tolerancji na zastosowaną w badaniach chiralną ciecz jonową. Wartości  $EC_{50}$  oszacowane na podstawie wielkości inhibicji długości korzeni, części nadziemnych roślin i plonu świeżej masy były większe, niż te wyznaczone dla jęczmienia i wynosiły odpowiednio 352 mg, 270 mg i 194 mg/kg suchej masy gleby.

Uzyskane w omawianym eksperymencie wazonowym wyniki badań znajdują pełne odzwierciedlenie w dostępnej literaturze [21,24–29,47–49]. W cytowanych pracach autorzy stwierdzili, że niskie stężenia ILs mogą nawet powodować stymulację wzrostu roślin, działając podobnie, jak np. hormony wzrostu, podczas gdy wysokie stężenia tych substancji prowadzą do niemalże liniowego spadku plonu, długości pędów roślin i ich korzeni. Za najbardziej istotny biomarker fitotoksyczności niektórzy badacze [50] uważają inhibicję długości korzeni, ze względu na funkcje tych organów, związane m.in. z trzymaniem rośliny w podłożu, pobieraniem wody i składników pokarmowych oraz ich transportem. Prawidłowy rozwój i kondycja korzeni, warunkuje zatem optymalny wzrost i rozwój rośliny, co z kolei przekłada się na wielkość i jakość plonu. Różnice w budowie korzeni pomiędzy roślinami jedno- i dwuliściennymi są ponadto odpowiedzialne za różną toleran-

cję tych roślin na występowanie w podłożu ILs [51]. W swoich wcześniejszych badaniach [23,30,48] stwierdziliśmy również wyższą tolerancję roślin dwuliściennych na zastosowane CSA i ILs.

### 3.2. Wpływ [Im-Men][BF<sub>4</sub>] na zawartość barwników asymilacyjnych

Wszystkie rośliny zielone, zdolne do prowadzenia procesu fotosyntezy są wyposażone w system barwników asymilacyjnych, odpowiedzialnych m.in. za absorpcję światła. Barwniki asymilacyjne to niskocząsteczkowe substancje, występujące w błonach tylakoidów w połączeniu z białkami. Do najważniejszych barwników asymilacyjnych zaliczyć można chlorofile i karotenoidy, różniące się między sobą nie tylko budową chemiczną, ale również pełnionymi funkcjami. Jedynym barwnikiem, który jest zdolny do prowadzenia reakcji fotochemicznej jest chlorofil *a* i to tylko te cząsteczki, które umieszczone są w centrach fotoukładów PSI i PSII. Pozostałe barwniki (chlorofil *b* i karotenoidy) nazywane są barwnikami antenowymi, ponieważ ich rolą jest wychwytywanie energii i przekazywanie jej do centrum reakcji. Karotenoidy (karoteny i ksantofile) oprócz funkcji antenowej pełnią także funkcję ochronną, polegającą na rozpraszaniu w postaci ciepła nadmiaru energii dostarczanej do centrów fotoukładów [10,52,53].

Chloroplasty są organellami komórkowymi, które są wyjątkowo podatne na produkcję RFT, co związane jest z dużą ilością energii pochłanianej przez barwniki asymilacyjne. W momencie kiedy mechanizmy fotochronne są niewystarczające, wzbudzony chlorofil reaguje z tlenem dając tlen sin-

gletowy <sup>1</sup>O<sub>2</sub> i inne rodniki, pochodne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Powstałe RFT utleniają i uszkadzają białka występujące w PSII, zaburzając jego normalne funkcjonowanie. Obniża to wydajność fotosyntezy, ograniczając tym samym wzrost i rozwój roślin. Do takich wniosków doszli autorzy, którzy dokonali oceny wpływu stresu oksydacyjnego wywołanego przez różne czynniki zewnętrzne na funkcjonowanie systemów PSI i PSII oraz mechanizmy rozpraszania nadmiaru energii [2,7,10,54].

Z uwagi na powyższe wnioski, w wielu pracach dotyczących oddziaływania różnych czynników stresogennych na zmiany fizjologiczne roślin, oznacza się zawartość barwników asymilacyjnych [8,37,52,55]. Coraz częściej, również w pracach dotyczących określenia fitotoksyczności CSA i ILs oznacza się zmiany poziomu chlorofilu i karotenoidów, jako jednego z objawów stresu oksydacyjnego [24,26–30,39,53]. Niektórzy badacze [24,29] dowodzą ponadto, że chlorofil jest najważniejszym biomarkerem stresu oksydacyjnego, którego zmiany są ściśle skorelowane m.in. z zahamowaniem wzrostu roślin. Islam i wsp. [56] uważają również, że zawartość chlorofilu jest dobrym wskaźnikiem zdrowotności liści roślin.

Analiza wyników dotyczących oddziaływania [Im-Men][BF<sub>4</sub>] na zawartość barwników asymilacyjnych w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej jednoznacznie dowodzi o inhibitującym wpływie tej soli na poziom chlorofilu i karotenoidów. W omawianym eksperymencie zastosowana CIL prowadziła do systematycznego obniżania się zawartości tych barwników w obu roślinach, co było skorelowane ze wzrostem stężenia [Im-Men][BF<sub>4</sub>] w glebie (Tabela 2).

**Tabela 2.** Zawartość barwników asymilacyjnych w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej uprawianych na glebie z dodatkiem [Im-Men][BF<sub>4</sub>] (średnia ± odch. stand., *n* = 3).

Stężenie CIL mg/g s.m. gleby	Barwniki asymilacyjne mg/g św.m.					
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl <i>a+b</i>	Chl <i>a/Chl b</i>	Chl <i>a+b/Car</i>
Jęczmień jary						
0	9.402 ±0.064	2.783 ±0.064	2.523 ±0.010	12.185 ±0.119	3.378 ±0.049	4.830 ±0.054
1	8.759 ±0.048	2.636 ±0.026	2.390 ±0.034	11.394 ±0.032	3.322 ±0.047	4.767 ±0.042
10	9.017 ±0.056	2.672 ±0.043	2.430 ±0.051	11.689 ±0.086	3.374 ±0.048	4.810 ±0.074
50	7.605 ±0.055	2.293 ±0.027	2.405 ±0.157	9.899 ±0.036	3.317 ±0.062	4.116 ±0.102
100	7.696 ±0.153	2.419 ±0.089	2.390 ±0.022	10.115 ±0.239	3.183 ±0.061	4.232 ±0.044
400	5.068 ±0.245	1.564 ±0.086	1.607 ±0.039	6.632 ±0.331	3.140 ±0.031	4.127 ±0.059
700	–	–	–	–	–	–
1000	–	–	–	–	–	–
NIR <sub>0,05</sub>	0.153	0.080	0.086	0.216	0.062	0.079
Rzodkiewka zwyczajna						
0	9.341 ±0.178	3.573 ±0.094	2.544 ±0.015	12.914 ±0.271	2.614 ±0.032	5.076 ±0.067
1	8.645 ±0.086	3.221 ±0.036	2.406 ±0.049	11.866 ±0.121	2.684 ±0.012	4.932 ±0.028
10	8.623 ±0.064	3.363 ±0.119	2.345 ±0.065	11.986 ±0.229	2.546 ±0.140	5.111 ±0.078
50	7.229 ±0.065	2.873 ±0.062	2.063 ±0.036	10.162 ±0.128	2.537 ±0.055	4.926 ±0.037
100	6.808 ±0.025	2.552 ±0.077	1.884 ±0.002	9.359 ±0.083	2.667 ±0.141	4.968 ±0.046
400	5.204 ±0.017	1.964 ±0.023	1.545 ±0.005	7.168 ±0.033	2.650 ±0.077	4.639 ±0.101
700	4.227 ±0.095	1.610 ±0.044	1.599 ±0.031	5.837 ±0.137	2.625 ±0.053	3.650 ±0.050
1000	2.844 ±0.006	1.371 ±0.017	1.258 ±0.006	4.217 ±0.014	2.074 ±0.095	3.352 ±0.048
NIR <sub>0,05</sub>	0.276	0.081	0.035	0.156	0.083	0.114

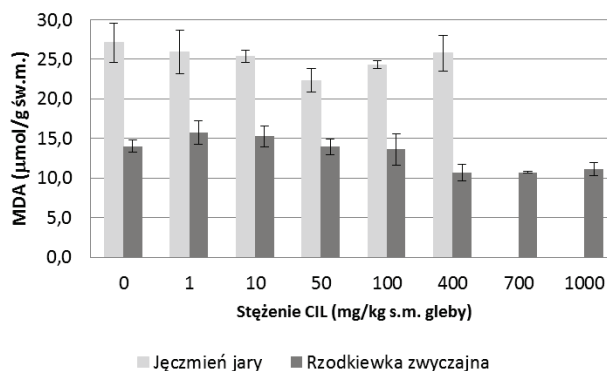
W przypadku jęczmienia jarego udało się dokonać analizy barwników asymilacyjnych do stężenia 400 mg CIL na kg gleby, obserwowany wówczas spadek poziomu chlorofilu całkowitego (Chl *a+b*) i karotenoidów wynosił odpowiednio 46% i 36% w porównaniu do kontroli. Analizę zawartości barwników asymilacyjnych w liściach rzodkiewki zwyczajnej dokonano w całym zakresie zastosowanych stężeń, a na obiektach o najwyższej koncentracji CIL (1000 mg/kg gleby) stwierdzono około 67% obniżenie się zawartości chlorofilu całkowitego i około 51% spadek poziomu karotenoidów w odniesieniu do kontroli.

Oprócz zawartości barwników asymilacyjnych, bardzo ważnym wskaźnikiem oceny zmian fizjologicznych jest określenie wzajemnego stosunku chlorofilu *a* do chlorofilu *b* (Chl *a*/Chl *b*). Wiadomo bowiem, że wzrost wartości Chl *a*/Chl *b* traktowany jest jako niezawodny wskaźnik stresu. Obniżenie się natomiast wartości tego wskaźnika ma dwojakie znaczenie. Jeżeli wynika tylko ze wzrostu zawartości Chl *b*, to jest to symptom korzystnych zmian poziomu barwników asymilacyjnych, decydujących o odpowiednim poziomie wychwytywania światła. Spadek stosunku Chl *a*/Chl *b* wynikający ze spadku poziomu Chl *a* świadczy natomiast o dużych uszkodzeniach fotosystemów i idącą za tym fotoinhibicją [13,55]. W przypadku badań własnych, w jęczmieniu jarym stwierdzone zmiany wartości Chl *a*/Chl *b* były niewielkie, wyraźnie widać natomiast tendencję spadkową tego wskaźnika w obiektach na których zastosowano stężenia CIL równe 100 i 400 mg/kg gleby. W przypadku rzodkiewki zwyczajnej, statystycznie istotny spadek wartości stosunku Chl *a*/Chl *b* stwierdzono jedynie po zastosowaniu najwyższego stężenia CIL (Tabela 2). W literaturze [39] istnieje pogląd, że obniżenie syntezy barwników asymilacyjnych na skutek oddziaływania ILs dotyczy głównie Chl *a*, stąd wynika obserwowany także w naszej pracy spadek stosunku wartości Chl *a*/Chl *b* w w/w przypadkach.

Innym istotnym wskaźnikiem decydującym o wielkości stresu oksydacyjnego w roślinach jest stosunek zawartości Chl *a+b* do zawartości karotenoidów (Chl *a+b*/Car) [37,55]. Spadek wartości tego stosunku jest niezbitym dowodem istnienia stresu oksydacyjnego w roślinach, a jednocześnie wskazuje na próbę obrony, poprzez zwiększenie zawartości karotenoidów, bo jak wiadomo barwniki te są skutecznymi zmiataczami RFT [8,9,53]. Zarówno w przypadku jęczmienia jarego, jak i rzodkiewki zwyczajnej, stwierdzono wyraźny spadek wartości Chl *a+b*/Car, co związane jest ze zwiększeniem się poziomu karotenoidów, w stosunku do zawartości chlorofilu całkowitego. Świadczyć to może o skutecznej obronie antyoksydacyjnej w obu badanych roślinach.

### 3.3. Wpływ CIL na poziom peroksydacji lipidów i akumulację H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Stopień peroksydacji lipidów w roślinach określany jest za pomocą zawartości nadtlenków lipidów (LOOH) lub lotnego dialdehydu malonowego (MDA). Dialdehyd malonowy jest produktem rozkładu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w błonach białkowo-lipidowych, głównie kwasu linolowego. Wzrost zawartości MDA w komórkach roślinnych jest niepodważalnym wskaźnikiem panującego stresu oksydacyjnego i pośrednio odzwierciedla również stopień uszkodzenia komórki. Dlatego poziom MDA jest jednym z flagowych wskaźników, określanych zawsze w przypadku badań wielkości stresu oksydacyjnego w roślinach poddanych róż-



**Rysunek 2.** Wpływ [Im-Men][BF<sub>4</sub>] na zawartość dialdehydu malonowego w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej (średnia ± odch. stand., *n* = 3).

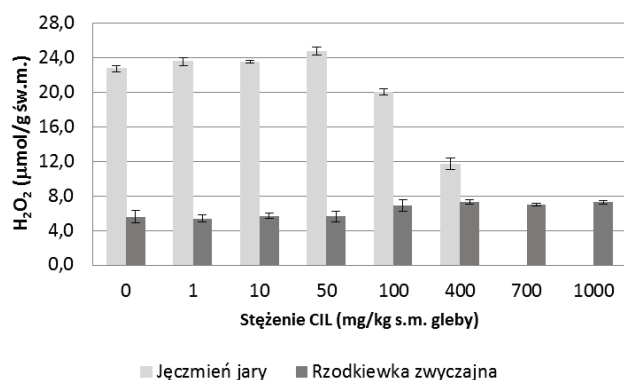
nym stresogennym czynnikiem biotycznym i abiotycznym [4, 10,13,25,57,58].

W omawianej pracy, siewki jęczmienia jarego uprawiane na glebie zawierającej wzrastające ilości [Im-Men][BF<sub>4</sub>] nie akumulowały zwiększonych ilości MDA. W liściach rzodkiewki zwyczajnej, początkowo zaobserwowano niewielki wzrost, a następnie począwszy od stężenia 400 mg CIL/kg gleby, średnio około 25% obniżenie się zawartości dialdehydu malonowego w odniesieniu do kontroli (Rysunek 2). Taki trend zmian analizowanego biomarkera stresu oksydacyjnego może sugerować, że w obu roślinach poprawnie funkcjonuje obrona antyoksydacyjna.

W literaturze naukowej, dotyczącej oddziaływania ILs na zmiany biochemiczno-fizjologiczne w roślinach dominuje pogląd, że zastosowane związki prowadzą do wyraźnego wzrostu zawartości MDA, który z reguły jest skorelowany ze stężeniem soli w pożywce [24–26,28,53]. Obserwowaną tendencję zmian zawartości MDA badacze tłumaczą faktem, że wysokie stężenia ILs generują tak duży stopień stresu oksydacyjnego, z którym mechanizmy obronne roślin nie są już w stanie sobie poradzić. Istnieją jednakże prace naukowe [29,30] wskazujące na fakt, że wielkość akumulacji MDA jest w bardzo dużym stopniu uzależniona również od cech gatunkowych roślin.

Kolejnym biomarkerem, świadczącym o zaistniałym stresie oksydacyjnym jest obserwowana w komórkach roślinnych akumulacja nadtlenku wodoru. Wzrost poziomu tej reaktywnej formy tlenu w roślinach zachodzi zawsze wtedy, gdy stwierdza się w komórkach wzmoczoną detoksykację anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) prowadzoną przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) oraz wtedy, gdy zawodzi w roślinach enzymatyczne mechanizmy detoksykacji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [6,12,24,27,59,60]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest ponadto najbardziej stabilną cząsteczką chemiczną spośród wszystkich RFT, zdolną do szybkiego przenikania przez wszystkie błony komórkowe [7]. Zhang i wsp. [53], Liu i wsp. [26] i Biczak [29] uzależniają ponadto akumulację H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od stężenia ILs w środowisku wegetacji roślin, co zaobserwowali odpowiednio dla rzęsy wodnej, siewek pszenicy i jęczmienia jarego oraz rzodkiewki zwyczajnej.

W badaniach własnych stwierdzono, że rzodkiewka zwyczajna akumulowała w swoich komórkach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a obserwowany wzrost był dodatnio skorelowany ze stężeniem zastosowanej soli. Największy, około 23%–30% wzrost zawartości nadtlenku wodoru w liściach rzodkiewki zwyczajnej w porównaniu do kontroli, zaobserwowano w roślinach uprawianych



**Rysunek 3.** Wpływ [Im-Men][BF<sub>4</sub>] na zawartość H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej (średnia ± odch. stand., n = 3).

na glebie z zawartością CIL od 100 mg do 1000 mg/kg gleby. Zupełnie inaczej prezentują się zmiany zawartości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w siewkach jęczmienia jarego. Do stężenia 50 mg/kg s.m. gleby nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości tej formy RFT w siewkach jęczmienia jarego, podczas, gdy dalsze zwiększanie koncentracji tej soli w glebie spowodowały około 50% redukcję zawartości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w porównaniu do kontroli (Rysunek 3). Zaistniała sytuacja może wiązać się ze zróżnicowaną aktywnością enzymów detoksykujących H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w jęczmieniu jarym i rzodkiewce zwyczajnej, co zostało opisane w Rozdziale 3.4. niniejszej pracy.

Należy jednocześnie pamiętać, że H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nie jest całkowicie usuwany z komórek przez enzymy, ponieważ w niskich zawartościach, w warunkach stresu, pełni on funkcje sygnalizacyjną [55].

### 3.4. Wpływ CIL na zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych

Chcąc zapobiec skutkom stresu oksydacyjnego, rośliny w drodze ewolucji wykształciły system przeciwutleniaczy. Oprócz niskocząsteczkowych związków chemicznych, rośliny dysponują specyficznym układem enzymów, do których zaliczyć można m.in. dysmutazy nadadtlenkowe (SOD), katalazę (CAT), peroksydazy (POD) i reduktazę glutationową (GR). Działanie tych enzymów jest wzajemnie skorelowane, ponieważ kolejno przekształcają one wygenerowane w komórkach roślinnych RFT do związków nietoksycznych [2,6,8,12].

Pierwszą linię obrony przed RFT stanowi SOD, która rozkłada anionorodnik nadadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>. SOD to ogólna nazwa całej rodziny metaloenzymów, które prowadzą dysmutację O<sub>2</sub><sup>•-</sup> w różnych organellach komórkowych, a mianowicie: Mn-SOD w mitochondriach, Fe-SOD w plastydach, Cu/Zn-SOD w cytozolu i chloroplastach [2,61]. SOD eliminując O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zapobiega tym samym peroksydacji lipidów, dlatego aktywność tego enzymu jest jedną z pierwszych, jaką oznacza się w pracach naukowych dotyczących określenia oddziaływania stresu oksydacyjnego na zmiany biochemiczno-fizjologiczne w roślinach [25,27,29,30,53,55]. Wyniki prezentowanych w literaturze badań nie pozwalają jednak na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków, co do kierunku zmian aktywności SOD w roślinach poddanych warunkom stresu oksydacyjnego. Wzrost aktywności SOD pod wpływem ILs obecnych w podłożu obserwowali w sadzonkach ryżu Liu i wsp. [25] i Liu i wsp. [28], w siewkach pszenicy Liu i wsp.

[26] i jęczmienia Cvetko Bubalo i wsp. [24] czy roślinach bobu Liu i wsp. [27]. Wielkość zmian aktywności SOD autorzy uzależniają od gatunku rośliny oraz stężenia ILs. Jednak w dostępnej literaturze można znaleźć również prace [14] dowodzące, że np. stres oksydacyjny związany z fumigacją ozonem nie miał żadnego wpływu na aktywność SOD w kapuście.

Analiza wyników badań prezentowanych w niniejszej pracy pokazała, że zarówno w siewkach jęczmienia jarego, jak i liściach rzodkiewki zwyczajnej nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian aktywności dysmutazy nadadtlenkowej pomiędzy kontrolą, a roślinami uprawianymi na glebie z dodatkiem [Im-Men][BF<sub>4</sub>]. W obu roślinach zaobserwowano jednak niewielkie obniżenie się aktywności tego enzymu po zastosowaniu niskich stężeń CIL, przy wyższych stężeniach tego związku aktywność enzymu wzrastała (Tabela 3). Warto jednocześnie zaznaczyć, że zmiany aktywności SOD w obu roślinach były powiązane z zawartością w nich MDA.

Powstały w wyniku reakcji dysmutacji anionorodnika nadadtlenkowego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest bardzo stabilną cząsteczką i jak już wspomniano na łamach niniejszej pracy, zdolną do przenikania przez wszystkie błony komórkowe. W związku z tym rośliny dysponują systemem enzymów zajmujących się detoksykacją H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jednym z nich jest katalaza (CAT), enzym zlokalizowany głównie w peroksyzomach i glioksyzomach, który powoduje rozkład H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bezpośrednio do H<sub>2</sub>O i O<sub>2</sub>. Peroksydaza, będąca zaś zbiorem izoenzymów występujących w wielu organellach komórkowych, jest odpowiedzialna za rozkład H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przy udziale związków fenolowych (pirogalol, benzydyna, gwajakol) lub niektórych antyoksydantów (kwas askorbinowy) [2,62,64].

Prezentowane w dostępnej literaturze zmiany aktywności CAT, wskutek zaistniałego stresu oksydacyjnego, nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków co do ich kierunku. Niektórzy autorzy prac [2,8,11,24] o reakcji roślin na występowanie w środowisku czynników stresogennych, obserwowali wzrost aktywności wszystkich enzymów antyoksydacyjnych, w tym także CAT. Podobnie w naszych badaniach, w siewkach jęczmienia jarego uprawianego na glebie zawierającej największe ilości [Im-Men][BF<sub>4</sub>] stwierdzono wzrost aktywności CAT o 24% w porównaniu do kontroli (Tabela 3). Taki kierunek zmian aktywności CAT tłumaczy niejako opisane już wcześniej obniżenie się poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach jęczmienia jarego, co może być związane z faktem, że jak podają Anjaneyulu i wsp. [2] oraz Chen i wsp. [55], rolą CAT jest usuwanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podczas gdy rola POD ogranicza się do regulacji ilości tej RFT w komórkach.

Dokonując przeglądu literaturowego można znaleźć jednak prace, które wyraźnie dowodzą obniżania się aktywności CAT w roślinach poddanych warunkom stresu [6,26,58,62]. Do jeszcze innych wniosków doszli Liu i wsp. [25], Liu i wsp. [28], Liu i wsp. [27] oraz Biczak [29], którzy w sadzonkach ryżu i bobu, siewkach jęczmienia i roślinach rzodkiewki uzależniają kierunek zmian aktywności CAT od czasu trwania stresu oksydacyjnego i stężenia CSA i ILs w podłożu. Autorzy obserwowali bowiem, przy niższych stężeniach badanego ksenobiotyku wzrost aktywności CAT, podczas gdy wysokie stężenia soli wyraźnie prowadziły do redukcji aktywności tego enzymu. W omawianym eksperymencie nie stwierdzono jednak żadnych istotnych zmian aktywności tego enzymu w liściach rzodkiewki zwyczajnej, stąd najprawdopodobniej wynikała obserwowana akumulacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w liściach tej rośliny rosnącej na glebie z wysoką zawartością [Im-Men][BF<sub>4</sub>] (Tabela 3). Taki

**Tabela 3.** Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, POX, CAT) w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej uprawianych na glebie z dodatkiem [Im-Men][BF<sub>4</sub>] (średnia ± odch. stand., *n* = 3).

Stężenie CIL mg/kg s.m. gleby	Aktywność enzymatyczna		
	Dysmutaza ponadtlenukowa U/mg białka	Katalaza U/mg białka·min	Peroksydaza U/mg białka·min
Jęczmień jary			
0	10.239 ±0.712	0.0272 ±0.0014	10.055 ±0.140
1	9.654 ±0.340	0.0288 ±0.0014	10.223 ±0.376
10	9.340 ±0.190	0.0257 ±0.0017	9.917 ±0.400
50	9.449 ±0.218	0.0247 ±0.0013	10.336 ±0.293
100	10.391 ±0.381	0.0280 ±0.0032	12.508 ±0.399
400	10.403 ±0.704	0.0336 ±0.0023	17.749 ±0.040
700	–	–	–
1000	–	–	–
NIR <sub>0.05</sub>	0.373	0.0024	0.575
Rzodkiewka zwyczajna			
0	10.239 ±0.712	0.0250 ±0.0042	0.486 ±0.032
1	9.654 ±0.340	0.0274 ±0.0015	0.523 ±0.017
10	9.340 ±0.190	0.0238 ±0.0000	0.590 ±0.022
50	9.449 ±0.218	0.0249 ±0.0000	0.634 ±0.010
100	10.391 ±0.381	0.0237 ±0.0009	0.780 ±0.016
400	10.403 ±0.704	0.0247 ±0.0013	0.967 ±0.024
700	10.391 ±0.381	0.0235 ±0.0000	1.418 ±0.130
1000	10.403 ±0.704	0.0235 ±0.0009	3.769 ±0.137
NIR <sub>0.05</sub>	0.072	0.0028	0.426

kierunek zmian aktywności katalazy może być związany z budową tego enzymu [63]. Inaktywacja katalazy następuje bowiem po przyłączeniu się substancji chemicznej do miejsca aktywnego enzymu, do którego prowadzi bardzo wąski kanał. Dlatego duże cząsteczki ILs nie zawsze są w stanie pokonać tej bariery przestrzennej. Z tego względu katalaza jest dość odpornym enzymem na inhibujące działanie cieczy jonowych. Brak jednoznaczności co do kierunku zmian aktywności CAT pod wpływem różnych czynników zewnętrznych, upoważnia ponadto do stwierdzenia, że aktywność tego enzymu, podobnie jak aktywność SOD, nie może być traktowana jako wiarygodny marker istnienia stresu oksydacyjnego w roślinie [1].

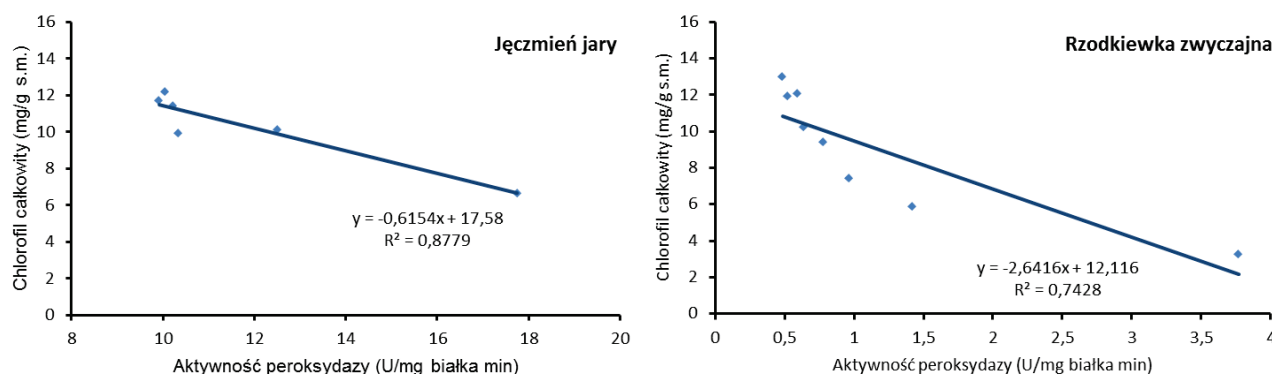
Zupełnie inaczej prezentuje się opinia wielu naukowców, dotycząca zmian aktywności POD w wyniku zaistniałego stresu oksydacyjnego. Praktycznie wszyscy autorzy są zgodni, że nadmiar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest bodźcem, który natychmiast powoduje wzrost aktywności tego enzymu, bez względu na przyczynę stresu [2,11,25,29,30,58]. Niektórzy badacze [9,53], wbrew istniejącym opiniom o jedynie regulującej roli POD, wnioskuje o dużo większym powinowactwie tego enzymu do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, niż w przypadku CAT. Jak bardzo istotną jest rola POD w detoksykacji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mogą świadczyć obserwacje Wang i wsp. [39], którzy uważają, że wzrost aktywności POD będzie następował zawsze, gdy tylko czynniki stresogenne będą oddziaływać na roślinę i tak długo, jak będzie ona zdolna prowadzić swoją vegetację w tych warunkach.

Wyniki badań własnych niebicie dowodzą, że zastosowana w eksperymencie CIL spowodowała wzrost aktywności

POD, zarówno w siewkach jęczmienia jarego, jak i roślinach rzodkiewki zwyczajnej (Tabela 3). Obserwowane zwiększenie się aktywności omawianego enzymu było dodatnio skorelowane ze wzrostem stężenia [Im-Men][BF<sub>4</sub>] w glebie. Warto jednocześnie zaznaczyć, że w siewkach jęczmienia jarego aktywność POD była zasadniczo większa, niż stwierdzona w liściach rzodkiewki zwyczajnej, co znalazło odbicie w poziomie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach tych roślin. Prezentując wyniki badań dotyczących aktywności POD w jęczmieniu jarym i rzodkiewce zwyczajnej, można wnioskować, że zmiany aktywności tego enzymu, podobnie jak zawartość barwników asymilacyjnych, są bardzo dobrym biomarkerem istnienia stresu oksydacyjnego w tych roślinach. Do podobnych wniosków doszli wcześniej Zhang i wsp. [53] oraz Liu i wsp. [26] analizując zmiany aktywności POD w rzęsie wodnej i siewkach pszenicy pod wpływem imidazoliowych cieczy jonowych. W naszych wcześniejszych badaniach [29] również sugerowaliśmy, że aktywność POD w liściach rzodkiewki zwyczajnej i siewkach jęczmienia jarego była doskonałym wskaźnikiem skażenia gleby QAS z anionami BF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Warto także zaznaczyć, że obserwowany wzrost aktywności POD, często skorelowany ze spadkiem zawartości barwników, to wyraźny symptom świadczący o przedwczesnym starzeniu się rośliny [29,64].

W przeglądzie literaturowym, coraz częściej zwraca się jednak uwagę na fakt, że wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych nie jest jednak do końca korzystny dla organizmów roślinnych. Enzymy te bowiem nie tylko zmiatają szkodliwe RFT, ale mogą upośledzać metabolizm roślin poprzez usuwanie także tych cząsteczek RFT, które są odpowiedzial-





**Rysunek 4.** Korelacja pomiędzy aktywnością POD, a zawartością chlorofilu całkowitego w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej uprawianych na glebie z dodatkiem [Im-Men][BF<sub>4</sub>] ( $p < 0.05$ ).

ne za sygnalizację komórkową [1]. Wang i wsp. [39] podaje ponadto, że wysoki poziom aktywności POD odpowiada za uszkodzenia chlorofilu w siewkach pszenicy. W omawianym eksperymencie stwierdziliśmy również ujemną korelację pomiędzy wzrostem aktywności POD, a obniżeniem się zawartości chlorofilu całkowitego (Rysunek 4).

Stwierdzona zależność świadczyć może o sytuacji, w której obserwowany spadek zawartości chlorofilu całkowitego wynikał nie tylko bezpośrednio ze wzrostu w glebie stężenia CIL, ale również był rezultatem zaistniałego, niekontrolowanego wzrostu aktywności POD w obu roślinach eksperymentalnych.

#### 4. Wnioski

Przeprowadzone badania dotyczące określenia wpływu [Im-Men][BF<sub>4</sub>] na wzrost oraz rozwój jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej niezabicie pokazały, że zastosowana CIL charakteryzowała się fitotoksycznością. Wielkość toksycznego oddziaływania uzależniona była głównie od stężenia i od gatunku rośliny. Roślina jednoliścienna – jęczmień jary – była bardziej wrażliwa niż rzodkiewka zwyczajna (roślina dwuliścienna) na zastosowaną w badaniach wazonowych ciecz jonową. Świadczy o tym m.in. procent inhibicji długości części nadziemnych, długości korzeni i plonu świeżej masy.

Zastosowany w eksperymencie wazonowym [Im-Men][BF<sub>4</sub>] spowodował spadek zawartości barwników asymilacyjnych w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej, co w konsekwencji znalazło odzwierciedlenie we wspomnianym już spadku świeżej masy tych roślin. CIL prowadziła jednocześnie do wystąpienia w obu roślinach oznak stresu oksydacyjnego, o czym może świadczyć wzrost aktywności peroksydazy, będącej jednocześnie najczulszym biomarkerem zaistniałego stresu oksydacyjnego.

Uzyskane w badaniach wyniki mogą być przydatne do oceny potencjalnego zagrożenia skażenia środowiska naturalnego cieczami jonowymi. Uzyskana zaś wiedza dotycząca zmian fizjologiczno-biochemicznych w siewkach jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej, może być bardzo pomocna w zrozumieniu samego mechanizmu fitotoksyczności ILs dla lądowych roślin wyższych. Efekty naszych badań mogą być także wykorzystane w doborze takich gatunków i odmian roślin uprawnych, które na glebach zanieczyszczonych ILs będą lepiej radzić sobie ze stresem oksydacyjnym, co w praktyce spowoduje uzyskanie odpowiedniej wielkości i jakości plonów.

#### Podziękowania

Praca została sfinansowana z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie oraz Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej na badania statutowe jednostki.

#### Literatura

- [1] J. Dragičić Maksimović, J. Zhang, F. Zeng, B.D. Živanović, L. Shabala, M. Zhou, S. Shabala, *Plant Soil*, **2013**, 365, 141–155.
- [2] E. Anjaneyulu, P.S. Reddy, M.S. Sunita, P.B.K. Kishor, B. Meriga, *J. Plant Physiol.*, **2014**, 171, 789–798. doi: 10.1016/j.jplph.2014.02.001.
- [3] A. Król, R. Amarowicz, S. Weidner, *J. Plant Physiol.*, **2015**, 189, 97–104. doi: 10.1016/j.jplph.2015.10.002.
- [4] R. Rosalie, J. Joas, Ch. Deytieu-Belleau, E. Vulcain, B. Payet, L. Dufossé, M. Léchaudel, *J. Plant Physiol.*, **2015**, 184, 68–78. doi: 10.1016/j.jplph.2015.05.019.
- [5] G. Noctor, C. Lelarde-Trouverie, A. Mhamdi, *Phytochem.*, **2015**, 112, 33–53. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.002.
- [6] E. Sánchez-Rodríguez, M. Rubio-Wilhelmi, L.M. Cervilla, B. Blasco, J.J. Rios, M.A. Rosales, L. Romero, J.M. Ruiz, *Plant Sci.*, **2010**, 178, 30–40. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.10.001.
- [7] D. Di Baccio, A. Castagna, R. Tognetti, A. Ranieri, L. Sebastiani, *J. Plant Physiol.*, **2014**, 171, 1693–1705. doi: 10.1016/j.jplph.2014.08.007.
- [8] Z. Gengmao, H. Yu, S. Xing, L. Shihui, S. Quanmei, W. Changhai, *Ind. Crops Prod.*, **2015**, 64, 175–181. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.10.058.
- [9] R. Jbir-Koubaa, S. Charfeddine, W. Ellouz, M.N. Saidi, R. Gargouri-Bouaid, O. Nouri-Ellouz, *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, **2015**, 120, 933–947. doi: 10.1007/s11240-014-0648-4.
- [10] M. Rachoski, A. Gazquez, P. Calzadilla, R. Bezus, A. Rodriguez, O. Ruiz, A. Menendez, S. Maiale, *Acta Physiol. Plant.*, **2015**, 37, 117. doi: 10.1007/s11738-015-1865-0.
- [11] S. Ali, P. Bai, F. Zeng, S. Cai, I.H. Shamsi, B. Qiu, F. Wu, G. Zhang, *Environ. Exp. Bot.*, **2011**, 70, 185–191. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.09.002.
- [12] R.C. Noqueiro, F.A. Monteiro, P.L. Gratão, L. Borgo, R.A. Azevedo, *Environ. Monit. Assess.*, **2015**, 187, 73. doi: 10.1007/s10661-015-4282-3.
- [13] Q. Wang, X. Que, R. Zheng, Z. Pang, C. Li, B. Xiao,

- Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2015**, *22*, 9646–9657. doi: 10.1007/s11356-015-4104-8.
- [14] P. Rozpądek, I. Ślesak, S. Cebula, P. Waligórski, M. Dziurka, A. Skoczowski, Z. Miszalski, *J. Plant. Physiol.*, **2013**, *170*, 1259–1266. doi: 10.1016/j.jplph.2013.04.018.
- [15] H.W. Choi, B.K. Hwang, *Planta*, **2012**, *235*, 1369–1382.
- [16] M. Messali, Z. Moussa, A.Y. Alzahrani, M.Y. El-Naggar, A.S. ElDouhaibi, Z.M.A. Judeh, B. Hammouti, *Chemosphere*, **2013**, *91*, 1627–1634. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.12.062.
- [17] B. Peric, J. Sierra, E. Martí, R. Cruañas, M.A. Garau, J. Arning, U. Bottin-Weber, S. Stolte, *J. Hazard. Mater.*, **2013**, *261*, 99–105. doi: 10.1016/j.hazmat.2013.06.070.
- [18] G. Chatel, J.F.B. Pereira, V. Debbeti, H. Wahg, R.D. Rogers, *Green Chem.*, **2014**, *16*, 2051–2083. doi: 10.1039/c3gc41389f.
- [19] M. Cvjetko Bubalo, K. Radošević, I. Radojčić Redovniković, J. Halambek, V.G. Srček, *Ecotox. Environ. Saf.*, **2014**, *99*, 1–12. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.019.
- [20] M. Matzke, S. Stolte, J. Arning, U. Uebers, J. Filser, *Ecotoxicology*, **2009**, *18*, 197–203. doi: 10.1007/s10646-008-0272-3.
- [21] R. Biczak, P. Bałczewski, B. Bachowska, B. Pawłowska, J. Kaźmierczak-Barańska, M. Cieślak, B. Nawrot, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2013**, *188*, 459–461. doi: 10.1080/10426507.2012.737880.
- [22] R. Biczak, B. Pawłowska, P. Bałczewski, B. Bachowska, B. Herman, *Ecol. Chem. Eng. A*, **2013**, *20*, 621–630. doi: 10.2428/ecea.2013.20(06)057.
- [23] R. Biczak, B. Pawłowska, J. Feder-Kubis, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2015**, *22*, 11740–11754. doi: 10.1007/s11356-015-4327-8.
- [24] M. Cvjetko Bubalo, K. Hanousek, K. Radošević, V.G. Srček, T. Jakovljević, I. Radojčić Redovniković, *Ecotox. Environ. Saf.*, **2014**, *101*, 116–123. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.12.022.
- [25] H. Liu, S. Zhang, X. Hu, C. Chen, *Environ. Pollut.*, **2013**, *181*, 242–249. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.007.
- [26] T. Liu, L. Zhu, H. Xie, J. Wang, J. Wang, F. Sun, F. Wang, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2014**, *21*, 3936–3945. doi: 10.1007/s11356-013-2348-8.
- [27] T. Liu, L. Zhu, J. Wang, J. Wang, H. Xie, *J. Hazard. Mater.*, **2015**, *285*, 27–36. doi: 10.1016/j.hazmat.2014.11.028.
- [28] H. Liu, S. Zhang, X. Zhang, C. Chen, *J. Hazard. Mater.*, **2015**, *286*, 440–448. doi: 10.1016/j.hazmat.2015.01.008.
- [29] R. Biczak, *J. Hazard. Mater.*, **2016**, *304*, 173–185. doi: 10.1016/j.hazmat.2015.10.055.
- [30] B. Pawłowska, R. Biczak, *Chemosphere*, **2016**, *149*, 24–33. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.072.
- [31] X. Miao, J. Feder-Kubis, C. Fischmeister, J. Pernak, P. Dixneuf, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 3687–3690. doi: 10.1007/s10870-008-9495-7.
- [32] J. Feder-Kubis, M. Kubicki, J. Pernak, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **2010**, *21*, 2709–2718. doi: 10.1016/j.tetasy.2010.10.029.
- [33] J. Feder-Kubis, J. Bryjak, *Acta Biochim. Pol.*, **2013**, *60*, 741–775.
- [34] J. Pernak, J. Feder-Kubis, A. Cieniecka-Rostlonkiewicz, C. Fischmeister, S.T. Griffin, R.D. Rogers, *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 879–892. doi: 10.1039/B616215K.
- [35] A. Telesiński, M. Śnioszek, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **2009**, *4*, 1148–1154.
- [36] B.A. Schubert, A.H. Jahren, *Agric. Ecosyst. Environ.*, **2011**, *140*, 174–181.
- [37] C. Arias-Baldrich, N. Bosch, D. Begines, A.B. Feria, J.A. Monreal, S. García-Mauriño, *J. Plant Physiol.*, **2015**, *183*, 121–129. doi: 10.1016/j.jplph.2015.05.016.
- [38] OECD/OCDE 208 2006. Guidelines for the testing of chemical. Terrestrial plant: seedling test: seedling emergence and seedling growth test.
- [39] L.S. Wang, L. Wang, L. Wang, G. Wang, Z.H. Li, J.J. Wang, *Environ. Toxicol.*, **2009**, *24*, 296–303. doi: 10.1002/tox.20435.
- [40] R. Oren, K.S. Werk, N. Buchmann, R. Zimmermann, *Can. J. For. Res.*, **1993**, *23*, 1187–1195.
- [41] D.M. Hodges, J.M. DeLong, Ch.F. Forney, R.K. Prange, *Planta*, **1999**, *207*, 604–611.
- [42] H.P. Singh, D.R. Batish, R.K. Kohli, K. Arora, *Plant Growth Regul.*, **2007**, *53*, 65–73. doi: 10.1007/s10725-007-9205-z.
- [43] C.N. Giannopolitis, S.K. Ries, *Plant Physiol.*, **1977**, *59*, 309–314.
- [44] M. Kar, D. Mishra, *Plant Physiol.*, **1976**, *57*, 315–319.
- [45] N.A. Abassi, M.M. Kushad, A.G. Endress, *Sci. Horti.*, **1998**, *74*, 183–194.
- [46] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248–254.
- [47] R. Biczak, B. Bachowska, P. Bałczewski, *Proc. ECOpole*, **2010**, *4*, 105–114.
- [48] R. Biczak, P. Bałczewski, B. Pawłowska, B. Bachowska, P. Rychter, *Ecol. Chem. Eng. S*, **2014**, *21*, 281–295. doi: 10.2478/eces-2014-0022.
- [49] R. Biczak, B. Pawłowska, P. Bałczewski, P. Rychter, *J. Hazard. Mater.*, **2014**, *274*, 181–190. doi: 10.1016/j.hazmat.2014.03.021
- [50] N. Chapman, A.J. Miller, K. Lindsey, W.R. Whalley, *Trends Plant Sci.*, **2012**, *17*, 701–710.
- [51] M. Matzke, S. Stolte, J. Arning, U. Uebers, J. Filser, *Green Chem.*, **2008**, *10*, 584–591. doi: 10.1039/b717811e
- [52] T. Tounekti, A.M. Vadel, M. Oñate, H. Khmeira, S. Munné-Bosch, *Environ. Exp. Bot.*, **2011**, *71*, 298–305. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.12.016.
- [53] B. Zhang, X. Li, D. Chen, J. Wang, *Protoplasma*, **2013**, *250*, 103–110. doi: 10.1007/s00709-012-0379-5.
- [54] A. Oukarroum, F. Bussotti, V. Goltsev, H.M. Kalaji, *Environ. Exp. Bot.*, **2015**, *109*, 80–88. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.08.005.
- [55] Y. Chen, F. Lin, H. Yang, L. Yue, F. Hu, J. Wang, Y. Luo, F. Cao, *Acta Physiol. Plant.*, **2014**, *36*, 3173–3187. doi: 10.1007/s11738-014-1684-8.
- [56] M.K. Islam, M.S. Khanam, S.Y. Lee, I. Alam, M.R. Huh, *POJ*, **2014**, *7*, 499–509.
- [57] R. Juknys, G. Vitkauskaitė, M. Račaitė, J. Vencloviene, *Cent. Eur. J. Biol.*, **2012**, *7*, 299–306. doi: 10.2478/s11535-012-0012-9.
- [58] K. Radošević, M. Cvjetko Bubalo, V.G. Srček, D. Grgas, T.L. Dragičević, I. Radojčić Redovniković, *Ecotox. Environ. Saf.*, **2015**, *112*, 46–53. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
- [59] M. Kumar, C.R.K. Reddy, B. Jha, *J. Appl. Phycol.*, **2013**, *25*, 369–378. doi: 10.1007/s10811-012-9871-8.
- [60] V. Demidchik, *Environ. Exp. Bot.*, **2015**, *109*, 212–228. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
- [61] A.C. Asensio, M. Gil-Monreal, L. Pires, Y. Gogorcena, P. Aparicio-Tejo, J.F. Morana, *J. Plant Physiol.*, **2012**, *169*, 1253–1260. doi: 10.1016/j.jplph.2012.04.019.
- [62] F.R. Cavalcanti, J.P.M.S. Lima, S.L. Ferreira-Silva, R.A. Viégas, J.A.G. Silveira, *J. Plant Physiol.*, **2007**, *164*, 591–600. doi: 10.1016/j.jplph.2006.03.004.
- [63] P.C.A.G. Pinto, A.D.F. Costa, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, *Chemosphere*, **2011**, *82*, 1620–1628. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.11.046.

- [64] B. Herman, R. Biczak, E. Gurgul, *Biologia Plant.*, **1998**, *41*, 607–611.