

X. Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia
Kolozsvár, 2007. május 26-27.

**Kétféle vízinvázió válaszreakcióinak
összehasonlítása a vízminőség
változásakor**

Rigó Ferenc

Sapientia – EMTE, Természettudományi és Művészeti Kar,
Környezetföldrajz Szak, IV. év

Témavezetők:

Szigyártó Lídia tanársegéd

EMTE, Természettudományi és Művészeti Kar, Környezetföldrajz Szak

dr. Fodorpataki László docens

BBTE, Biológia és Földtan Kar, Kísérleti Biológia Tanszék

Tartalomjegyzék

Bevezető	2
I. Elméleti alapok	3
I. 1. A vízi környezet minőségének biomonitorizálása	3
I. 2. A környezeti stresszhatások által kiváltott reakciók a növényekben	4
I. 2. 1. A nem sókedvelő növények halotoleranciájának megnyilvánulási formái: ozmoreguláció, sajátos iontranszport, antioxidáns védelem	5
I. 2. 2. A réztoxicitás hatására kialakuló élettani változások	7
II. Anyag és módszer.....	8
II. 1. A növényi anyag és a kísérleti körülmények	8
II. 2. Az indukált klorofill-fluoreszcencia paramétereinek mérése.....	10
II. 3. A fotoszintetikus pigmenttartalom spektrofotometriás meghatározása	10
II. 4. Az algatenyészetek sejtsűrűség-változásának citometriás meghatározása és a békalencse biomassza-termelésének gravimetriás meghatározása	11
II. 5. A Na ⁺ bioakkumulációjának lángfotometriás meghatározása	11
III. Eredmények és kiértékelésük.....	13
III. 1. A fényenergia hasznosításának maximális és effektív hatásfoka a kétféle vízinövényben a sóstressz és a réztoxicitás hatására	13
III. 2. A sóstressz és a rézfölösleg hatásai a vizsgált növények fotoszintetikus pigment- tartalmára	15
III. 3. A sóstressznek kitett növények bioakkumulációs képességének vizsgálata a növényi sejtek Na ⁺ tartalma alapján	18
III. 4. A vízminőség változásainak hatása a vizsgált növények populációinak fejlődésére és biomassza-termelésére	19
IV. Következtetések	23
Irodalomjegyzék.....	25

Bevezető

Az ipari forradalom kezdetétől a természeti környezetbe az ember egyre nagyobb mértékben beavatkozott. Ez a tevékenység oda vezetett, hogy mára jelentősen megváltozott a légkör, a talaj, a felszíni és felszín alatti vizek állapota. E földi szférák közül a legfontosabb a felszíni vizek állapotának védelme, mely csak annak pontos ismeretével valósulhat meg.

A növények nagy része nem képes a víz minőségének gyors változásához alkalmazkodni. Ennek következtében számos faj tűnik el az őshonos élőhelyéről. Minden növény belső sajátosságai szerint változatosságot mutat, így ugyanazon környezeti stresszre más-más reakciókkal válaszol. Számos esetben egyik élőlényfaj életfolyamataival sajátos életkörülményeket teremt más faj számára.

A talajok és édesvizek emelkedő sótartalma globális problémává vált, nemcsak a mezőgazdaság, hanem a környezetvédelem és a biodiverzitás megőrzése szempontjából is. Hasonlóképpen a bányászati és nyersanyag-feldolgozási tevékenységek környezetszennyező hatása, ennek időben történő monitorozása az élettudományok egyik alapvető aktuális kutatásterülete. Ilyen irányban a növényekkel végzett ökofiziológiai kutatások, bár a fejlett országokban lendületesen fejlődnek, nálunk kevésbé elterjedtek.

A kutatás célja a hasonlóságok és lényegi különbségek azonosítása abban, hogy az édesvizek két gyakori növénytípusa: egy planktonikus zöldalga és a vízben úszó hajtásos növényformát képviselő békalencse életműködési paraméterei miként változnak meg a vízminőség módosulásának hatására, a sótartalom és a rézkoncentráció növekedésére. Továbbá szintén célunk a vízminőség változására érzékenyebb, és ezáltal hatásosabban felhasználható fiziológiai paraméterek azonosítása.

Hasonló környezeti hatásokra, különböző típusú élőhelyeken az egyes életműködések más-más mértékben és irányban változhatnak. Feltételezhető, hogy az alapvető alkalmazkodási mechanizmusok alapja azonos mind az algában, mind a békalencsében, ellenben a kialakuló tűrőképesség megnyilvánulási formái változatosak lehetnek. Feltételezéseink alapján a kétféle növény életműködési paraméterei azonos irányba de eltérő mértékben változnak a sóstressz és a réztoxicitás hatása alatt.

Előző tanulmányok alapján a második hipotézis az, hogy az együttesen jelenlévő sóstressz és réztoxicitás nem egymástól függetlenül, hanem egymással valamilyen kölcsönhatásban eredményez változásokat a vízi növények életműködéseiben.

I. Elméleti alapok

I. 1. A vízi környezet minőségének biomonitorizálása

A növények azon tulajdonsága, hogy az őket érő környezeti stresszre elvándorlással vagy elrejtőzéssel nem válaszolhatnak, egy sor specifikus válaszreakció kialakulását eredményezi. Ebből kifolyólag az élettani paraméterek szoros kapcsolatban vannak a környezet minőségének változásával, olyannyira, hogy minőségi és mennyiségi meghatározásokat lehet végezni általuk. Az indikátor növények sok esetben nemcsak jelzik módosulásaival a megváltozott környezeti állapotot, hanem a különböző szennyező anyagokat – testükben felhalmozva – kivonják a környezetből (fitoextrakció és fitoremediáció). Ezen képességgel rendelkező növényeket az akkumulációs indikátorok csoportjába soroljuk.

Ahhoz, hogy az indikátornövények alkalmasak legyenek biomonitorizálásra, meg kell felelniük néhány alapvető követelménynek: az illető területre nézve endémikus fajnak kell lenniük; a gyökerek egységesen és gyorsan ki kell fejlődjenek csírázáskor, hogy szilárd rögzülést tegyenek lehetővé; a mérhetőség miatt, gyors növekedési tulajdonsággal kell rendelkezniük; érzékenyek legyenek a stresszorra, viszont kellő toleranciát mutassanak, hogy túléljék a káros környezeti hatást; statisztikai megbízhatósággal rendelkezzenek az akkumulált és a környezetben jelenlévő szennyezők összehasonlításában (Rai és Takabe, 2006).

A tapasztalat azt mutatja, hogy számos esetben különböző stresszorra ugyanazon növények hasonló képen reagálnak. Emiatt alakult ki a biomonitorizálásban az integrált módszerek használata, ami feltételezi az indikátor fajok használatát, az analitikai kémia módszereivel együttesen.

Az algák a leggyakrabban használt indikátor fajok a vízi környezet minőségének vizsgálatában. Az összes vízi élőhelyen alkalmazhatók, és széles szennyezési skála elemeire reagálnak. Rövid generációjú élőlények, gyors monitorizálási folyamatot biztosítva. Az egyéb mikroorganizmusokkal együtt főleg a vizek szervesanyag tartalmának a meghatározására

alkalmazzák. Emellett a peszticidek, nehézfémek, és számos mesterségesen előállított szerves anyag indikátorai. Másodlagos hatásuk a többtényezős környezeti változás kimutatásában nyilvánul meg, mely során több környezeti paraméter változása során egyetlen, azoktól különböző paraméter változik meg (pl. pH). A békalencse mely úszik a víz felszínén, az algák mellett kiváló peszticid és felületaktív anyag indikátor (Jenks és Hasegawa, 2006).

I. 2. A környezeti stresszhatások által kiváltott reakciók a növényekben

A növény és környezete közti kiegyensúlyozott kapcsolat akkor jön létre, ha a környezeti paraméterek az optimum intervallumon belül találhatók. Stresszfaktor lehet egy optimumtól jelentősen eltérő környezeti tényező, de lehet egy addig a növény számára ismeretlen környezeti tényező is. A környezeti tényező akkor tekinthető stresszfaktornak, ha a növény valamely életfolyamatait gátolja (a hatás az optimum-intervallumon kívülre esik). A stresszfaktorok által létrehozott jelenséget stresszhatásnak nevezzük.

A stresszhatás megszüntetésére a növény különböző védőanyagokat termel, emiatt a külső stressz működési megterhelésnek minősül. Ha a stressz rövid életű, időtartamú, valamint mérsékelt erejű, akkor a növény teljes felépülést érhet el (normális anyagcsere, stabilizálódott életműködési folyamatok). Ha a stresszfaktor hosszú időn keresztül hat a restabilizáció csak részleges lehet, ami következtében a növényben már morfológiai elváltozások is végbemennek (pl. növekedéscsökkenés). Ez a különböző élettani reakciók típusa miatt van, melyek lehetnek elasztikus (a stressz utáni időben visszaállnak az eredeti állapotba), vagy plasztikusak (módosult állapotban maradnak).

Ha egy kis intenzitású stresszfaktor sokszor jelentkezik a növény életében, akkor a növény ún. tűrőképessé válik az illető környezeti terhelésre. A stresszhatások számos esetben hatásaik által átfedik egymást, ez azt jelenti, hogy egyes esetekben az egyfajta stresszhatással szembeni tűrőképesség kialakulhat egy másik stresszhatás által indukált akkomodációként is. Ez az ún. kereszttolerancia előnyös a növények életfolyamatai számára. Jó példa a glutation felhalmozása általi védekezés, mely közrejátszik az oxidatív stressz, a patogének általi támadás, nehézfém toxicitás, xenobiotikus stressz, a szárazság és a hőstressz leküzdésében (Madhava és mtsai, 2006).

A stresszhatás szerint megkülönböztetünk egy másféle felosztást is: eustresszt (élénkítően hat a növények életfolyamataira, biztonsági készenléti állapotot tartva fenn), és distresszt (ez annyira megterhelő, hogy a növény nem tudja elviselni károsodás nélkül).

A környezeti káros tényezők hatásának folyamata többszakaszos. Első fázisban, ahogy egy károsító környezeti tényező megjelenik, valamely élettani folyamat normális állapota megváltozik, azaz lecsökken a normális szint alá, rövid idejű akut károsodást okozva. A következő fázisban megjelennek a különböző ellensúlyozó mechanizmusok. A restitúció (eredeti szintre való helyreállítás) után következik az edződés folyamata. Ilyenkor az életműködés a normálisnál magasabb szintre emelkedik, amit a növény megtart a tolerancia teljes ideje alatt. Amikor a stresszhatás a tűréshatárt átlépi, bekövetkezik a kimerülés fázisa (ebben az esetben krónikus károsodás jelentkezik). A végső regeneráció szakaszában a károsodás kijavítása történik, visszaállítva az életműködést az eredeti állapothoz közeli szintre (Huang, 2006).

I. 2. 1. A nem sókedvelő növények halotoleranciájának megnyilvánulási formái: ozmoreguláció, sajátos iontranszport, antioxidáns védelem

A növények életkörülményeiknek eredményeképpen széles skálán helyezkednek el a környezeti hatásokra adott válaszreakciók szempontjából. Emiatt egyes növények jól tűrik a sós vizeket, míg mások ugyanilyen körülmények között elpusztulnak. Az antropogén hatásoknak, valamint a globális környezeti változásoknak következményeképpen olyan fajok kényszerülnek sós közegben élni, amelyek addig nem ismerték ezt a környezeti stresszhatást. A növényi szervezetben a magas NaCl koncentráció vízpotenciál csökkenést (vízvesztést), ionfluxus változást (pl. elégtelen kálium- és kalciumfelvételt) és toxikus hatást (pl. enzimgátlást) eredményez. (Parida és Das, 2005). A hatások együttesen növekedéscsökkenést váltanak ki. Ezen túlmenően a fölös sómennyiségnek zavaró hatása van a fő élettani folyamatokra: csirázásra, virágzásra, fotoszintézisre, fehérjeszintézisre, energia- és anyagcserére. A gyökérsérülés (sárga bevonat megjelenése), a levelek széleinek elhalása, a korai elsárgulás a sóstressz morfológiai következményei. Ahhoz, hogy a növény elviselje e környezeti káros hatótényezőt, többszintű és többkomponensű védekezési mechanizmust alakított ki: ozmoreguláció, sajátos iontranszport, antioxidáns védelem.

a) Ozmoreguláció

Az ozmoreguláció során a szervezet olyan vízben oldódó, kis molekulájú szerves anyagokat termel, melyek nagy mennyiségben felhalmozódva szabályozzák a belső vízegyensúlyt anélkül, hogy megzavarnák a növény metabolizmusát. Ezeket az anyagokat ozmolitikumoknak nevezzük. Ezek az oldott szerves anyagok nem szolnak bele a növény biokémiai reakcióiba, mindamellett, hogy pótolják és helyettesítik a különböző kationokat, melyeket a növény eltávolít a sóstresszel szembeni védőmechanizmus során. Ily módon nem gátlódnak az enzimek a működésük során. Az ozmolitikumok az említett szerepet ellátva megvalósítják a fellépő hidrosztatikai nyomáskülönbségek kiegyenlítését, általuk a növényi sejtek beltartalma, a sós külső közegnél nagyobb koncentrációjú lesz és képessé válik megőrizni víztartalmát (Tester és Davenport, 2003).

Az ozmolitikumok néhány esetben lehetnek ionok (pl. K^+), de főleg oldott szerves anyagok. Ilyenek az egyszerű cukrok: fruktóz és glukóz; a cukoralkoholok: glicerol, mannitol, szorbitol; az összetett cukrok: trehalóz, raffinóz és fruktán; aminosavak: prolin, glicin-betain, β -alanin-betain, prolin-betain; kéntartalmú vegyületek: kolin-szulfát, dimetil-szulfónium-propinát (Yokoi és mtsai, 2002).

Az ozmolitikumok gyakran vegyi védő szerepet töltenek be, ugyanis eltávolítják a sejtthártya sérült alkotóit és a sejt halálát okozó káros oxigénformákat, valamint védik és stabilizálják a fehérjéket és a sejt szerkezetét (Bartales és Sunkar, 2005).

b) Sajátos iontranszport

Belső fizikai-kémiai egyensúly (homeosztázis) az élő sejtek alapvető feltétele. A környezetből a növényeket gyakran a szokatlantól eltérő, magas ion koncentrációk érik. Ilyen lehet a magas sókoncentráció is. Ekkor gyorsan megváltozik a citoplazma kémiai összetétele.

A sejten belüli Na^+/K^+ egyensúly létfontosságú számos enzim működéséhez és szerves molekula épségéhez, valamint a membrán potenciál fenntartásához, ha ez felbomlik számos enzim és ezáltal a metabolizmus gátlódik. A magas sókoncentráció miatt a növényekben a Na^+ mennyisége növekszik, a K^+ -é pedig csökken. A hajtásos növényekben a NaCl akkumuláció lineárisan növekszik az időtartammal, valamint a fölös só mennyiségével (Wahid és Ghazanfar,

2006). A sajátos iontranszporton belül megvalósul egy aktív (Na^+/H^+ antiporter általi) és egy passzív (diffúzió általi) Na^+ transzport (Zhu, 2003).

c) Antioxidáns védelem

Sóstressz hatására a növényi sejtekben megnő a szuperoxid gyök és hidrogén peroxid koncentrációja. Ez gyakran membránlipidek peroxidációját eredményezi, ami által sérül a membránok szerkezete. Az antioxidáns védekezés céljával a sótűrés kialakulása során fokozódik az aszkorbát peroxidáz (APX), a kataláz (CAT), a szuperoxid diszmutáz (SOD) és glutation reduktáz (GR) enzimek aktivitása, ugyanakkor erős sóstresszre való érzékenység esetén ezeknek a védőenzimeknek a mennyisége csökken.

I. 2. 2. A réztoxicitás hatására kialakuló élettani változások

A növényi életfolyamatok egészséges működése számára szükséges a Cu jelenléte, de ugyanakkor magas koncentráció esetén mérgező hatásai vannak. Fontos szerepet játszik számos életfolyamatban: fehérjék működésének szabályzásában, fotoszintetikus elektrontranszportban, mitokondriális légzésben, oxidázok aktivátoraként (a szuperoxid diszmutáz, a citokróm oxidáz, aminoszuperoxidázok esetében) stb.

A túlzott rézmennyiség erősen mérgező a növény számára. Gátolja a gyökérnövekedést, nekrozist és klorozist okoz a levelek szintjén, a fotoszintetikus pigmentek mennyisége csökken. A szulfhidril csoportokhoz kapcsolódva fehérjéket károsít, ami enzimgátláshoz és a membrántranszport folyamatok zavarához vezet, ugyanakkor megbontja egyéb esszenciális tápelem (pl. Vas, mangán, cink) hiányát, továbbá oxidatív károsodást okoz (Drazkiewicz és mtsai, 2003; Yruela, 2005).

A magas réztartalom számos helyen gátolja a fotoszintetikus folyamatokat, a fényelnyelő pigmentek kialakulását és a növények biomassza-gyapadását (Sancenón és mtsai, 2004).

A nehézfém-toxicitással szembeni tűrőképesség alapja a fémfölség lekötése fitokelatinokkal, valamint a fémkomplexek elszigetelése a sejtfaltérbe történő kiválasztással vagy a vakuólumba való berekesztéssel. A szerves savaknak fontos szerep jut e fémek lekötésében.

II. Anyag és módszer

II. 1. A növényi anyag és a kísérleti körülmények

A laboratóriumi körülmények nagy előnye a természetes körülményekhez viszonyítva az, hogy azok a fizikai és kémiai paraméterek, melyek nagymértékben befolyásolják a kísérleti alanyok növekedését és fejlődését, tetszés szerint módosíthatóak, jól követhetőek, és állandó értéken tarthatóak.

Kísérleteink során olyan növényeket kellett keresni, melyek a természetben széles körben elterjedtek, és alkalmazhatók a környezetben is biológiai indikátorokként. A kiválasztott zöldalga és a békalencse olyan fajok bizonyultak, melyek elegendő ellenálló képességgel rendelkeznek, de ugyanakkor kellőképpen érzékenyen reagálnak a változásokra.

A *Scenedesmus opoliensis* cönóbiális szerveződésű zöld mikroalga (*Chlorococcales*, *Scenedesmaceae*) AICB141 törzse előnyös kísérleti alannak bizonyult. A *Scenedesmus* nemzetség a *Chlorophyceae* osztály *Chlorococcales* rendjének *Scenedesmaceae* családjába tartozik (Komárek és Fott, 1983).

A szélső sejtek középen kissé kihasasodnak, a végük fele elkeskenyednek, és pólusuk lemetszettnek tűnik. A köztes helyzetű sejtek olykor kissé ferdén helyezkednek el a cönóbiumokban, annak középtengelyéhez viszonyítva. A sejtek hossza (10)-12-22-(28) μm , míg szélessége (2,5)-4,5-6-(8,5) μm között változhat.

A *Lemna minor* a *Lemnaceae* családban lévő *Lemnoideae* alcsalád tagja. A *Lemna minor* faj az egész világon elterjedt (kozmpopolita). A békalencse egyszikű zárvatermő. Sajatossága a csökevényes hajtásban egymással összenőtt rövid szár és egyetlen levél. A kettő találkozási helyéből egyetlen el nem ágazó gyökér ered. Virágzata egyetlen hím virágot tartalmaz egy porzóval és két női virágot egy-egy termővel. Édesvizek felületén vegetatív módon nagyon gyorsan szaporodik. A mintát a Kolozsvári Botanikus Kert melegházából vettük, ahol már eleve meghatározott fajt kaptunk.

A kutatás során mindkét növény esetében a következő kísérleti változatokkal dolgoztunk:

1. Kontroll
 2. 150 mM NaCl fölösleg
 3. 25 μM Cu fölösleg
-

4. 150 mM NaCl + 25 μ M Cu fölösleg

A tenyészetek fenntartása érdekében egyszerű összetételű szervesen tápoldatokat kell készíteni, amelyek kielégítik a növények ásványi tápanyagszükségeit.

A *Scenedesmus opoliensis* tenyésztéséhez a Kuhl-Lorenzen (KL) tápoldatot használtuk.

A tápoldat összetétele és elkészítése: 1011 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KNO_3 , 621 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 179 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 22 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ mikroelem törzsoldat. A csapadékképződés elkerülése végett a tápsókat egyenként, meghatározott sorrendbe mértük be, mindig az előző tápsó látható feloldódása után. Fontos tényező a pH értékének helyes beállítása. Az alkotóelemek feloldása és a desztillált vízzel való hígítás után 20%-os NaOH oldattal 6,5-re kell állítani. Az így elkészített tápoldatból mindenik változónak kimértük a 200 ml mennyiséget. A kontroll csoport tápoldata változatlan maradt, a kísérleti csoportokhoz pedig hozzáadtuk az általunk előzőleg meghatározott NaCl (150 mM), CuSO_4 (25 μM), és a NaCl (150 mM) + CuSO_4 (25 μM) mennyiségeket. A megfelelő összetételű tápoldatok elkészítése után beoltottuk 10 ml-rel ugyanabból a steril algatenyészetből. Mindezt úgy, hogy minden pipettázás előtt megfelelő módon felkevertük. Ez utóbbi művelet lehetővé teszi, hogy egyforma algamennyiség kerüljön az egyes változatokba. Az átoltás steril légterű oltófülkében történt, megakadályozva ezzel a tenyészetek befertőzését.

A *Lemna minor* esetében a 4-szeresen hígított Hoagland-féle tápoldat biztosította a szükséges ásványi makro- és mikroelemeket. A tápoldat összetétele: 1,25 mM KNO_3 , 1,25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,5 mM MgSO_4 , 0,25 mM KH_2PO_4 , 4 μM FeEDTA, pH = 6,5. Az elkészítés módszere megegyezik a KL tápoldat elkészítésének a módszerével. Mindenik Petri-csészébe 50 ml tápoldatot adagoltunk. A kontroll csoport tápoldata változatlan maradt a kísérleti csoportokhoz pedig hozzáadtuk az általunk előzőleg meghatározott NaCl (150 mM), CuSO_4 (25 μM), és a NaCl (150mM) + CuSO_4 (25 μM) mennyiségeket. A következő lépésben mindegyik Petri-csésze tápoldatára 200-200 békalencsét helyeztünk ugyanabból a kezdeti populációból.

A tenyészetek fenntartása mindkét növény esetében 90 $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotonfluxus-sűrűségű fehér fényvel való, napi 14 órás megvilágítással történt, $25\pm 2^\circ\text{C}$ hőmérsékleten.

A statisztikai feldolgozhatóság érdekében mindegyik kísérleti változathoz három ismétlést végeztünk.

II. 2. Az indukált klorofill-fluoreszcencia paramétereinek mérése

A klorofill-fluoreszcencia paramétere a fényenergia fotoszintetikus hasznosulásának a mértékéről nyújtanak közvetlen és pontos információt. Ezért a klorofill-fluoreszcencia mérésének módszere egy nagyon érzékeny és korszerű módszer a növényeket érő környezeti stresszhatások mértékének meghatározásában.

A kísérletek során főleg két paraméter értékét vizsgáltuk: F_m/F_v és Φ . A sötétadaptált növényekben történő konvencionális klorofill-fluoreszcencia mérés a következő paraméterekre támaszkodik: F_0 (a sötétadaptált minta alapfluoreszcenciája), F_m (maximális fluoreszcencia a sötétadaptált mintában), F_v (fluoreszcencia-változás, mely az alap- és maximális fluoreszcencia különbsége). A modulált klorofill-fluoreszcenciának is két paraméterét használtuk: F_s (egyensúlyi fluoreszcencia), F_m' (az a fluoreszcencia intenzitás, amely a fényhez adaptált növényeknél mérhető, mikor minden PSII reakciócentruma zárva van).

Az F_v/F_m arány értéke az elnyelt fényenergia hasznosításának maximális (potenciális) hatásfokát méri, és értéke normális működésű fotoszintetikus rendszerben 0,8 körül van. A Φ -vel jelölt effektív (aktuális) fényhasznosítási kvantumhatásfok azt mutatja, hogy adott körülmények között az egyéb energiaátalakítási és levezetési folyamatok mellett az elnyelt fényenergia mekkora hányada hasznosul vegyi energia formájában az új szerves tápanyagok bioszintézise során.

A fluoreszcencia mérések egy növényi teljesítménymérő fluoriméterrel (FMS 1, Hansatech, Egyesült Királyság) történt. A növényi anyagot mérés előtt a műszer mintatartó részében 10 percig hagytuk sötétben adaptálódni, ezután pedig lemértük a konvencionális és a modulált klorofill-fluoreszcencia paramétereit.

II. 3. A fotoszintetikus pigmenttartalom spektrofotometriás meghatározása

A növényi sejtek fő fotoszintetikus pigmentjeinek a meghatározására a spektrofotometriás módszer nagyon jól alkalmazható, szerves oldószerrel történő kivonás után.

A vizsgált algasejtek pigmenttartalmának (klorofill-a, klorofill-b, karotenoidok) kivonásához extrahálószerként dimetilformamidot használtunk. Mindkét növény esetében lemértük a mennyiséget, amelyből a kivonat készült, az alga esetében pedig szűrletet készítettünk ismert térfogatú (50 ml) sejttenyészetből. A kioldás 3 ml dimetilformamiddal

történt zárt üvegben 2 napig sötétben tartva a mintákat. Mérés előtt az algamintákat centrifugálással (5 percig 5000 g-n) tisztítottuk meg a szilárd részecskéktől.

Mindegyik fotoszintetikus pigmenttípusnak sajátos fényelnyelési (abszorpciós) spektruma van, jól meghatározott hullámhossz értékeken található maximumokkal. A Jasco típusú UV-Vis spektrofotométerrel (Japán) mértük a pigmentkivonatok fényelnyelését 663,8 nm-en, 646,8 nm-en és 480,0 nm-es hullámhosszon. A számítások a következő képletek alapján történtek: klorofill-a = $12 \cdot A_{663,8} - 3,11 \cdot A_{646,8}$ ($\mu\text{g chl-a} \cdot \text{ml}^{-1}$); klorofill-b = $20,78 \cdot A_{646,8} - 4,88 \cdot A_{663,8}$ ($\mu\text{g chl-b} \cdot \text{ml}^{-1}$); karotenoidok = $1000 \cdot A_{480,0} - 1,12 \cdot \text{klorofill-a} - 34,07 \cdot \text{klorofill-b}$ ($\mu\text{g karotenoid} \cdot \text{ml}^{-1}$) (Porra, 1991).

II. 4. Az algatenyészetek sejtsűrűség-változásának citometriás meghatározása és a békalencse biomassza-produkciójának gravimetriás meghatározása

Az algapopulációk egyedsűrűségének nyomon követése a sejtosztódások ütemének mikroszkópos sejt számlálással való követésével történt. Minden 5. nap, ugyanabban az órában a Bürker-kamra felhasználásával (annak beosztási segítségével) véletlenszerűen meghatározott 40 mezőben számoltuk meg az algasejteket, minden kísérleti változat mindgyik ismétlésénél (Prat, 1994). A kapott számokat sejt $\cdot\text{ml}^{-1}$ értékekre adtuk meg. Mivel a változatok azonos kiinduló sejtsűrűségűek voltak, lehetőség nyílt az eredményeknek egymással szemben történő összehasonlítására és kiértékelésére.

A békalencse esetében analitikai mérleg segítségével határoztuk meg a tenyészetek nyers tömegének időbeni változását és a tenyészidő végén elért száraz biomassza-mennyiségét.

II. 5. A Na^+ bioakkumulációjának lángfotometriás meghatározása

A növények az életfolyamatok fenntartásához szükséges anyagcseréjük közben számos szerves anyagot vesznek fel abból a közegből, melyben élettevékenységüket folytatják. Aktív felvétellel az ott jelenlévő anyagokat képesek felhalmozni szervezetükben.

A kísérleti csoportok közül kettőben szerepel NaCl fölösleg. Annak kimutatására, hogy a tápközegben jelen levő mennyiségből a tenyészidő alatt a növények mennyi nátriumot vontak ki a vízből és gyűjtöttek fel testükben, lángfotométert használtunk. Mindkét növény esetében az ismert tömegű szárazanyaghoz hozzáadunk először 2 ml 65%-os HNO_3 -at, majd 0,5 ml

30%-os H_2O_2 -ot. Ezután konstans hőmérsékleten (90°C -on) homokfürdőben 2 óráig főztük, majd hagytuk szobahőmérsékletre lehűlni. Az így nyert oldatot 25 ml-re hígítottuk desztillált vízzel, úgy hogy közben jól belemostuk a főzésre használt üveg faláról az oda került oldatot. A 25 ml oldatot leszűrtük, és az átszűrődött oldatból lángfotometriás módszerrel meghatároztuk a Na mennyiségét. Az eredményeket a kontrollhoz viszonyítva százalékarányban tüntettük fel.

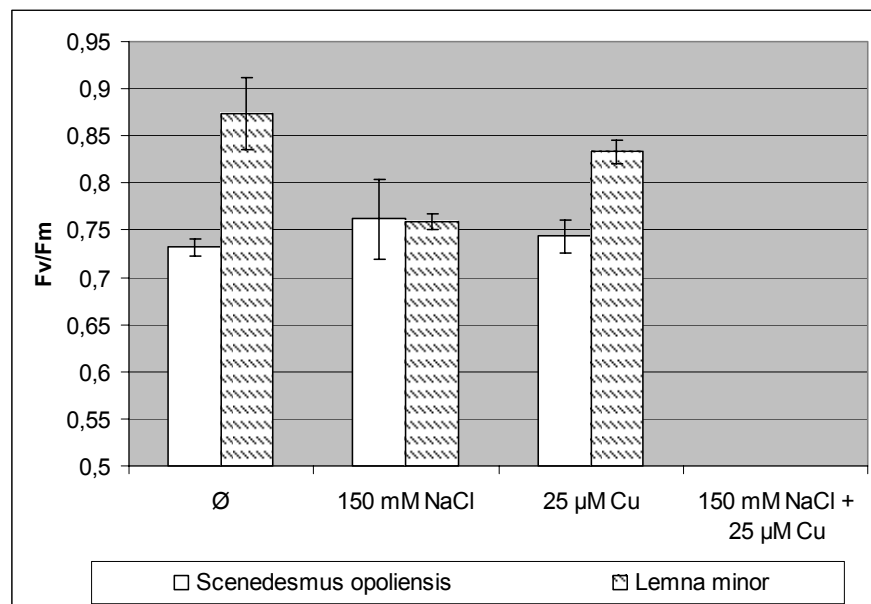
Az eredmények feldolgozásához a Microsoft Excel statisztika és elemző programot használtuk. A kontrollhoz viszonyított eltérések szignifikanciáját minden kísérleti változat esetében külön-külön a Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk ($p < 0,05$ -re).

III. Eredmények és kiértékelésük

III. 1. A fényenergia hasznosításának maximális és aktuális (effektív) hatásfoka a kétféle vízínövényben a sóstressz és a réztoxicitás hatására

A növények elsődleges szerepe minden életközösségben a napfény energiájának felhasználása új szerves tápanyag-mennyiségek elsődleges termelésére. A fotoszintetikus pigmentek által elnyelt fényenergiának csak egy bizonyos része alakul át hasznosítható vegyi energiává, másik része fluoreszcencia vagy hő kibocsátás formájában elvész. Minél kedvezőbb körülmények között fejlődik egy növény, a felfogott fényenergiának annál nagyobb része hasznosul kémiai úton a szén-dioxid asszimilációjában.

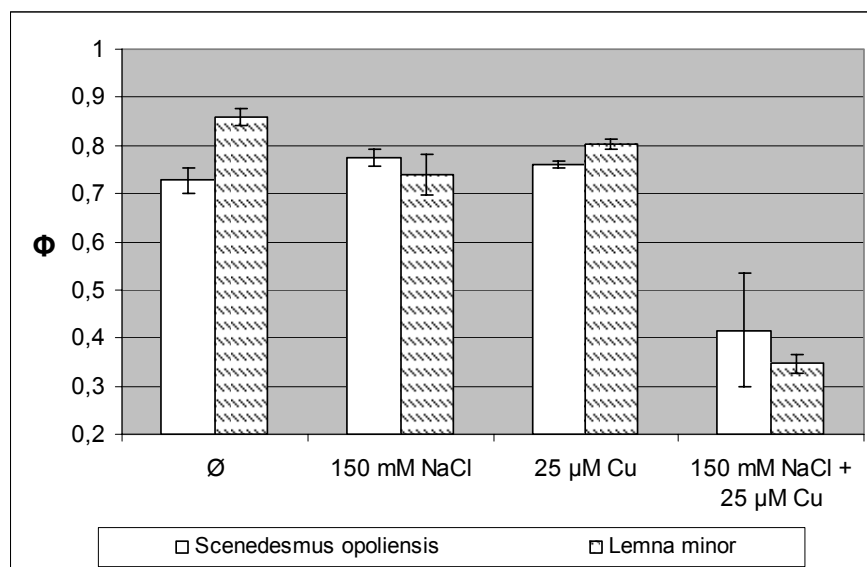
Az eredmények azt tükrözik, hogy ugyanolyan stresszkörülmények között a kétféle vízínövény fényenergiát hasznosító képessége nem egyforma módon változik (1. ábra).



1. ábra: A maximális fényhasznosítási hatásfok változása sóstressz és réztoxicitás hatására sötétadaptált növényekben mért indukált klorofill-fluoreszcencia alapján (Fv/Fm – változó és maximális fluoreszcencia közti arány, n = 3, p < 0,05)

A maximális fényhasznosítási hatásfok más a zöldalgánál és más a békalencsénél. Ez utóbbi a NaCl-főlöslegre sokkal érzékenyebben reagált, mint a Cu-többletre, míg az alga esetében az alkalmazott só- és rézkoncentrációk a kloroplasztiszok fotoszintetikus készülékében nem okoztak zavart a fényhasznosítási képesség tekintetében. Mindez azonban csak akkor igaz, amikor a kétféle stressztényezőt külön-külön alkalmaztuk. Ellenben akkor, amikor társítottuk a magas sókoncentrációt a réztöbbséggel, a két kedvezőtlen tényező együttes hatására a fényhasznosítási képesség gyakorlatilag teljesen megszűnt mind az alga, mind a békalence esetében. Ez azt mutatja, hogy a sóstressz és a réztoxicitás a fotoszintetikus fényhasznosítás szintjén nem egyszerűen összeadódik, hanem egymás hatását fokozzák, és egymással kölcsönhatásban sokkal erőteljesebb gátláshoz vezetnek, mint külön-külön. Együttesen oly mértékben terhelik a növényt, amit már nem tud más folyamatokkal kivédni.

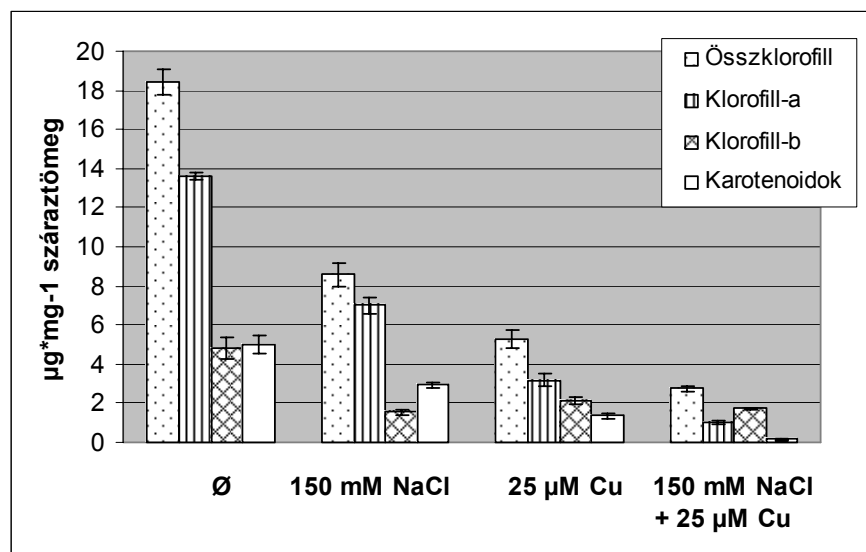
Az effektív fényhasznosítási kvantumhatásfok (2. ábra) értékei azt mutatják, hogy a békalence fotoszintetikus készüléke érzékenyebb a sótöbbség hatására, mint az algáé, ugyanakkor a maximális kvantumhatásfokhoz hasonlóan az effektív fényhasznosítási hatásfok is erőteljesen lecsökken a sóstressz és a rézfőlösleg együttes jelenlétében.



2. ábra: Az effektív fényhasznosítási kvantumhatásfok (Φ) változása sóstressz és réztoxicitás hatására a modulált klorofill-fluoreszcencia paramétereire alapján ($n = 3$, $p < 0,05$)

III. 2. A sóstressz és a rézfölösleg hatásai a vizsgált növények fotoszintetikus pigmenttartalmára

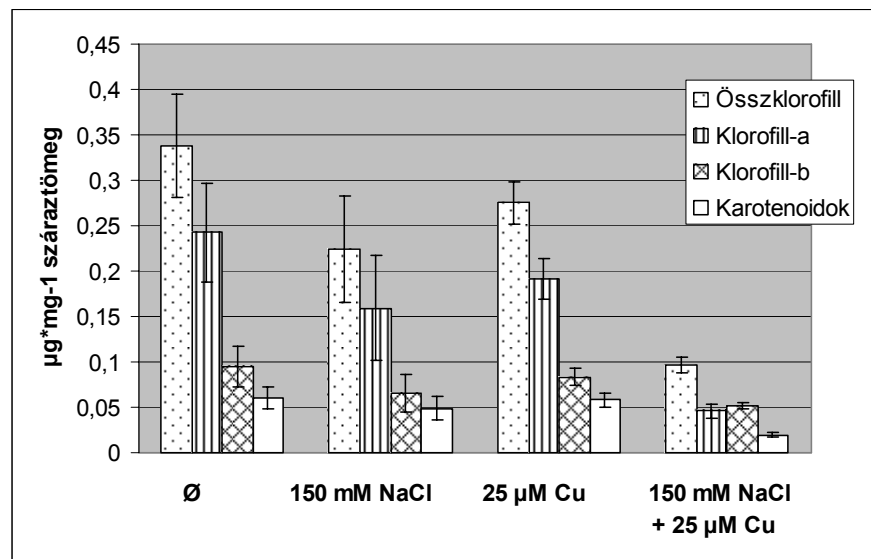
Zöldalgákban és hajtásos növényekben egyaránt a fotoszintetikus pigmenteket a klorofill-a, a klorofill-b és a karotenoidok képviselik. Ezek olyan sajátos növényi anyagok, melyek a kloroplasztiszok tilakoidmembránjaiban rögzülten elnyelik a növényt érő fény vörös és kék sugarainak energiáját, és ezt az energiát elvezetik a fotokémiai reakcióközpontokhoz, ahol egy része átalakul hasznosítható vegyi energiává. A fotoszintetikus pigmentek bioszintézisét és lebomlását, ezáltal pedig mennyiségük változását számos környezeti tényező befolyásolja, ami által ezek a külső tényezők kihatnak a növények energiagyűjtő és energiahasznosító képességére. A klorofilltartalom változása összefüggésben áll az indukált klorofill-fluoreszcencia paramétereivel, hiszen a fluoreszcenciaként kibocsátott fény a klorofill molekulák felől nem jut el a fotokémiai hasznosítás helyére.



3. ábra: A magas sótartalom és a rézszenyezés hatásai a zöldalga klorofill és karotenoid pigmenttartalmára (n = 3, p < 0,05)

Az algasejtek fotoszintetikus pigmenttartalmát a réztöbblet fokozottabban csökkenti, mint a 150 mM-os NaCl koncentráció, a két stressztényező együttes jelenlétében pedig hatásuk összeadódik, így a legkisebb pigmenttartalom a sófölösleget és rézfölösleget egyaránt

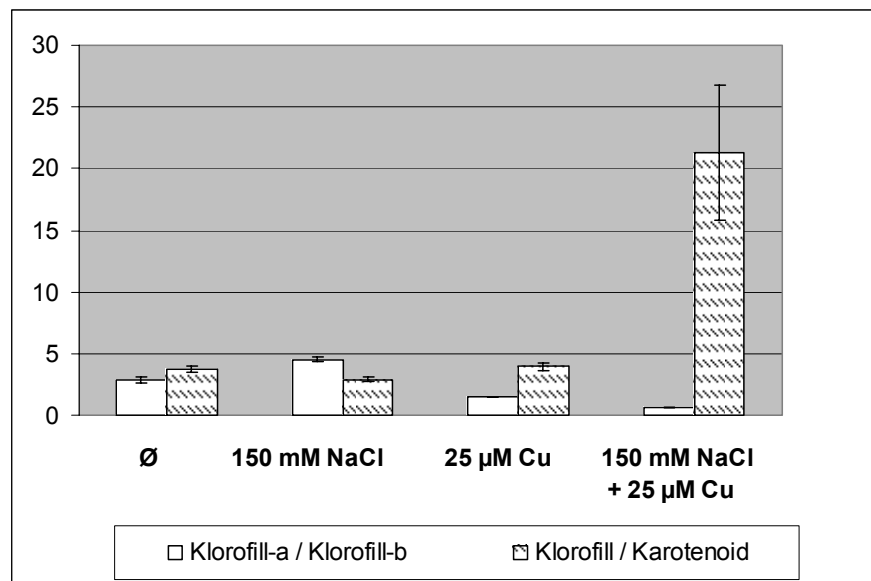
tartalmazó tápközegekben észlelhető. A klorofilok mennyisége minden esetben nagyobb mértékben csökken, mint a karotenoid pigmenteké. A békalence esetében, az algával ellentétben, a sóstressz nagyobb mértékben csökkenti a fotoszintetikus pigmenttartalmat, mint a réztoxicitás, ugyanakkor a két vegyi tényező hatása ebben az esetben is additív módon nyilvánul meg (3. és 4. ábra). Az algának a NaCl-dal szembeni fokozottabb toleranciája itt is kimutatható. A békalencsénél nem szignifikáns a különbség a NaCl és a Cu hatása között a fotoszintetikus pigmentek szintjén.



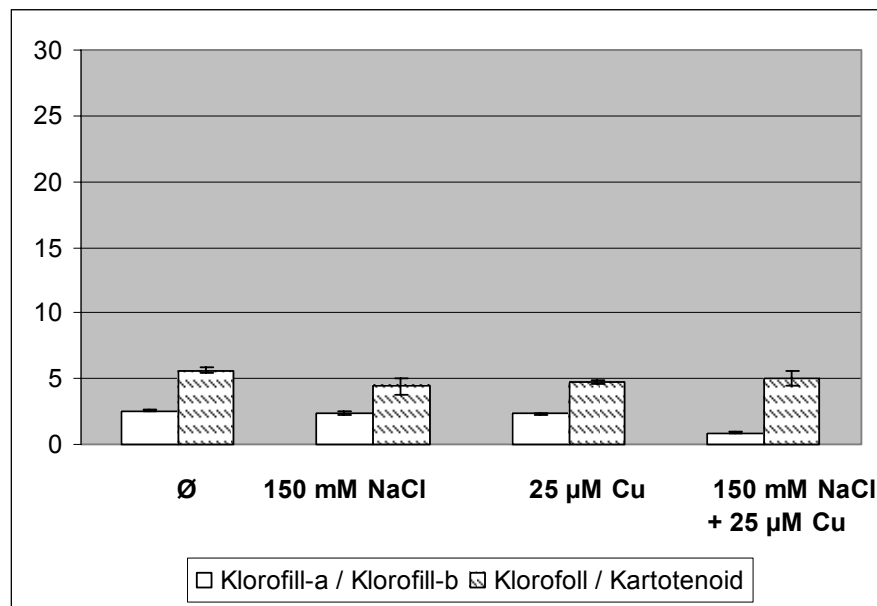
4. ábra: A magas sótartalom és a rézszennyezés hatásai a békalence klorofill és karotenoid pigmenttartalmára (n = 3, p < 0,05)

A zöldalga és a békalence fotoszintetikus pigmenttartalmának értékében nagyságrendbeli különbségek jelentkeznek (3., 4. ábra). Ennek oka, hogy az alga egysejtű és minden sejtben van egy-egy nagy kloroplasztisz tele klorofillal, míg a békalencsénél vannak nem asszimiláló gyökerelemek, szintelen védőszöveti sejtek és szintén kloroplasztiszok nélküli szállítószöveti elemek, továbbá a levelek belső asszimiláló sejtjeiben kisebb térfogatarányban található kloroplasztiszok, mint a zöldalgánál. Így a szárazanyagra vonatkoztatott klorofill mennyiség értéke a békalencsénél jóval kisebb.

Ugyanazok a környezeti körülmények gyakran nem egyforma mértékben befolyásolják a különböző fotoszintetikus pigmentek mennyiségének változását, így a pigmenttípusok közti arány változik. Jelen esetben a zöldalgában a klorofill a/b arány sóstressz hatására nőtt, réztöbblet hatására csökkent, a magas só- és rézkoncentráció társított alkalmazásakor pedig erőteljesen hanyatlott. Ez arra utal, hogy a sóstressz a klorofill-b-re hat erősebben, a réztöbblet pedig a klorofill-a mennyiségét csökkenti fokozottabban. Ez utóbbi hatás érvényesül a két stresszor együttes jelenlétében is. A klorofilok és karotenoidok közötti mennyiségi arány erősen megnő a só- és rézfölösleg együttes hatására, ami azt mutatja, hogy a kombinált vízminőség-változás erőteljesebb káros hatást fejt ki a karotenoidokra, mint a klorofilokra. Az algával ellentétben a békalencse esetében a klorofill/karotenoid arány nem változik számottevően a kontrollhoz viszonyítva, és a klorofill a/b arány is csak a só- és rézstressz társított alkalmazásakor csökken jelentősebb mértékben (5. és 6. ábra).



5. ábra: A fotoszintetikus pigmentek mennyiségi arányának változása az algában a vízminőség változtatásának hatására (n = 3, p < 0,05)

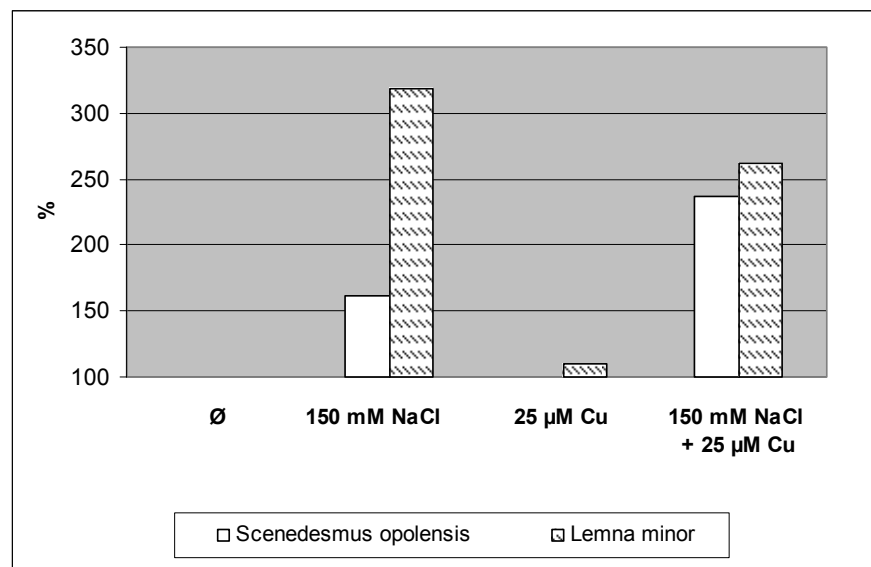


6. ábra: A fotoszintetikus pigmentek mennyiségi arányának változása a békalencsében a vízminőség változtatásának hatására ($n = 3$, $p < 0,05$)

III. 3. A sóstressznek kitett növények bioakkumulációs képességének vizsgálata a növényi sejtek Na^+ tartalma alapján

Aktív szállítási folyamatokkal a növények képesek a testükben felhalmozni a környezetükből felvett különböző anyagokat, és ha ezek környezetszennyező vegyületek, akkor a bioakkumuláció során e növények bizonyos mértékben megtisztítják élőhelyüket a szennyeződéstől. A Na^+ , ami a magas sótartalmú vízből halmozódik fel a növényi sejtek vakuólumában és sejtfalában, nem esszenciális tápelem a növények számára, nagy mennyisége pedig kifejezetten káros hatású.

Az eredmények azt mutatják (7. ábra), hogy a békalencse erősebb nátrium-akkumulációra képes, mint az alga, ugyanakkor a réztöbblet jelenlétében az alga Na-halmozása növekszik, míg a békalencséé csökken. A Cu fölösleg jelenléte az algatenyészetekben serkenti a Na^+ bioakkumulációját, míg a békalencse esetében csökkenti. Ha jelen van a Cu, akkor a két tesztnövény Na-akkumulációja egymáshoz közeli értékeket mutat.



7. ábra: A nátrium bioakkumulációja a zöldalgában és a békalencsében

A békalencse képes a sóstressz időtartalma alatt (15 nap) a kontroll által akkumulált mennyiség több, mint 300%-át is felhalmozni, ezzel szemben az alga ugyanezen idő alatt alig 60%-át akkumulálja. A Cu főleg jelenléte esetén a bioakkumulációs képesség az algánál közel 250%-os.

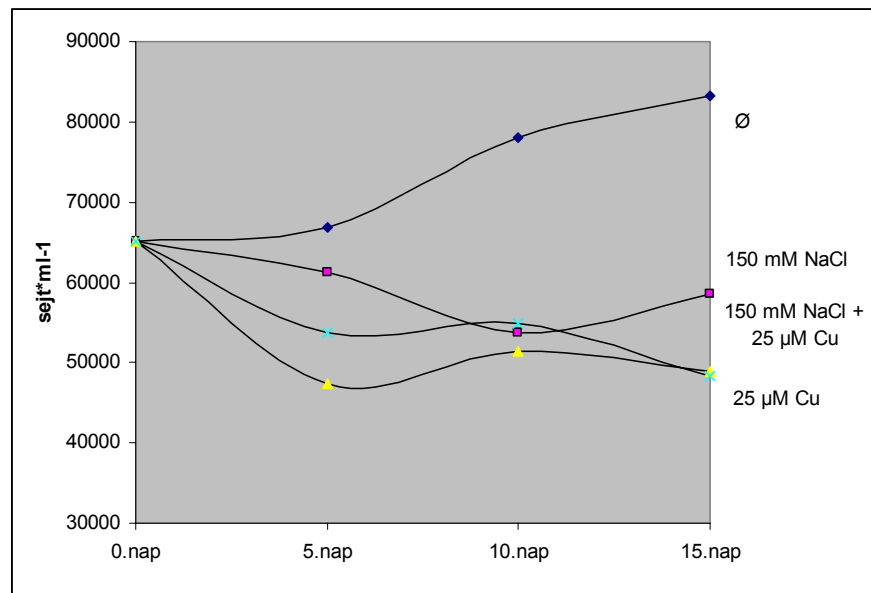
III. 4. A vízminőség változásainak hatása a vizsgált növények populációinak fejlődésére és biomassza-termelésére

A populációk egyedsűrűségének a változása összefüggésben áll az élettérben ható különböző környezeti paraméterek változásával. Így a populáció dinamikája számszerűleg értelmezve információt szolgáltat az ott lezajló folyamatokról.

Az algatenyészetek sejtsűrűségének időbeni változása más-más kinetikát mutat a különböző kísérleti változatokban, ami a környezeti körülmények minőségével kapcsolódik össze (8. ábra).

A stresszmentes (kontroll) algapopulációt sejtszámban fokozatos, de állandó növekedés jellemzi. A beoltás pillanatától az ötödik napig az összes többi kísérleti változatot sejtszámcsökkenés jellemzi. Általában ezen időszak alatt a növények megsínylik a változásokat, az érzékenyebb egyedek elpusztulnak vagy nem szaporodnak. Ezután a fennmaradó egyedek

fokozatosan kialakítanak egy bizonyos mértékű tűrőképességet és az új körülményekhez alkalmazkodva elkezdnek osztódni, kialakítva egy újabb, edzett populációt.

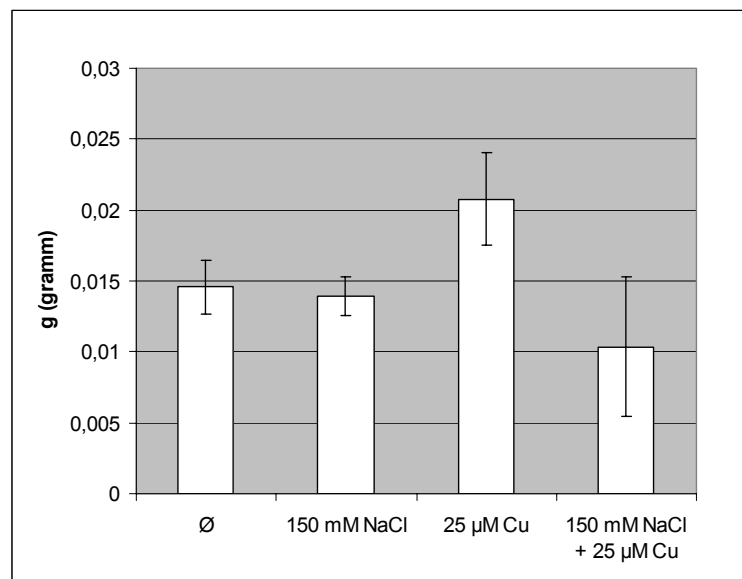


8. ábra: Az algapopulációk egyedsűrűségének időbeni változása NaCl-dal és CuSO₄-tal való vízszennyezés hatására (n = 3)

A NaCl-os közegben fejlődő algapopulációk egyedszám-változását tekintve hosszabb edződési folyamat figyelhető meg. Magyarázható ez azzal, hogy a gyengébb stresszhatás nem vált ki erős védekezést a növény részéről. A 15-ik napon már sejtszám-gyarapodás észlelhető a fennmaradt, tűrőképes egyedek osztódásának következtében. A vizsgálati időszak első részében az érzékenyebb egyedek (sejtek) elpusztultak, a második szakaszban pedig azok a sejtek, amelyek túléltek a kedvezőtlen hatást, bizonyos fokig tűrőképessé váltak a 150 mM-os NaCl-dal szemben.

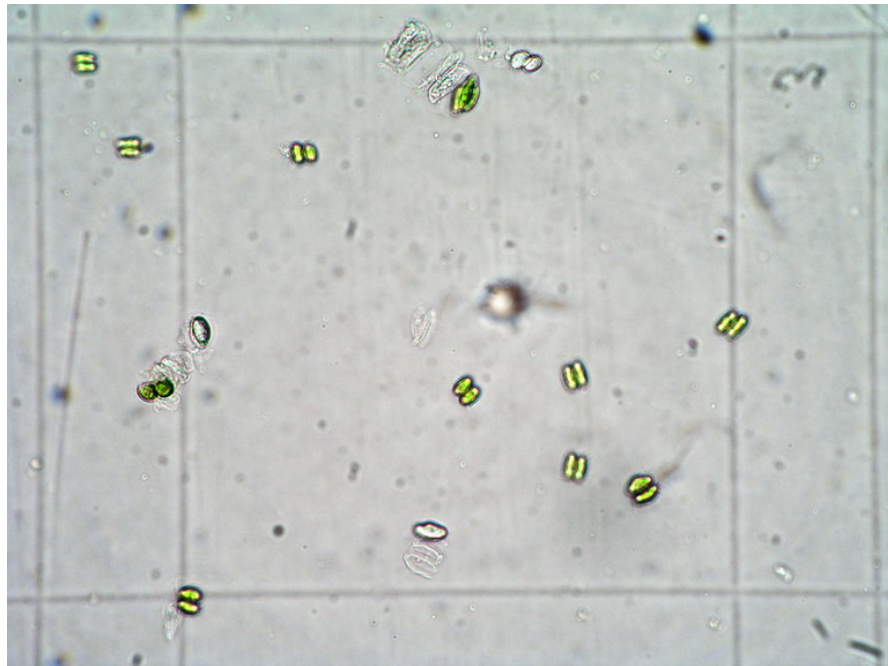
A legtöbb algasejt pusztulását a 25 µM-os Cu főleg váltotta ki, de az erős stressz gyors hozzászokási folyamatot idézett elő. A 10-ik napon már szaporodás jellemzi a tenyészeteket. A réz gátló hatása a sótöbblet jelenlétében kezdetben mérséklődik, majd a kettős stresszhatásnak kitett tenyészetek sejtsűrűsége közeledik a rézfölösleggel kezelt alacsony értékéhez. A sejtszám-változás tekintetében a sóstressz és a rézfölösleg hatásai nem adódnak össze és nem fokozzák egymást, hanem a sótöbblet enyhíti a réztöbblet hatását.

A békalencse tenyészetek végső száraz biomassza-mennyiségét a sóstressz nem módosította számottevően a kontrollhoz képest, ugyanakkor a réztöbblet, elsősorban a fokozott gyökernövekedés előidézése által, megnövelte a békalencsék biomasszáját. Ez a hatás viszont már nem érvényesült a réztöbblet és a só-többlet társításakor, amikor az együttesen ható két stressztényező biomassza-csökkenést eredményezett (9. ábra).

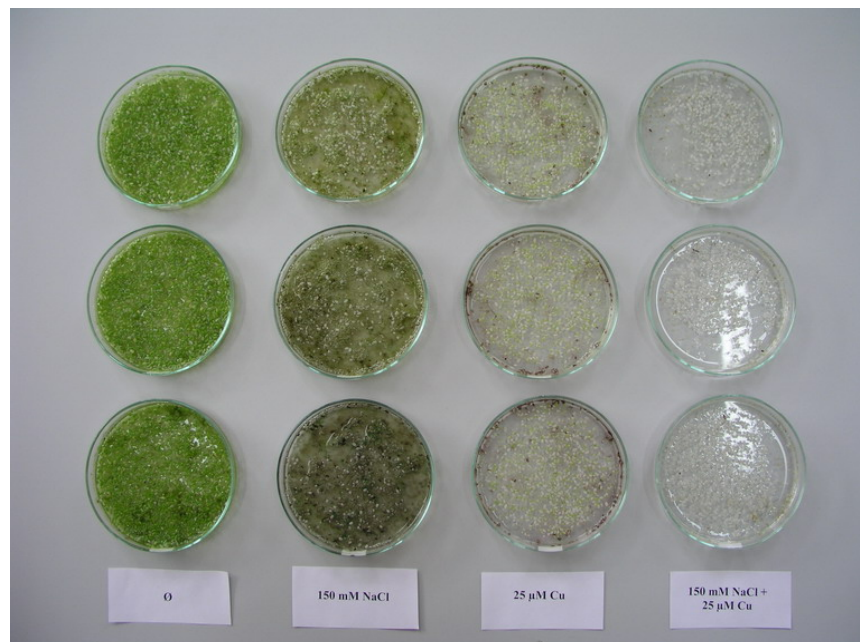


9. ábra: A békalencse (100-100 egyed) száraz biomassza mennyiségének változása NaCl-dal és CuSO_4 -tal való vízszennyezés hatására ($n = 3$)

A tenyészetek makroszkopikus morfológiája azt mutatja, hogy réztöbblet hatására a békalencsék zöld színe elhalványodik, míg magas sókoncentráció jelenlétében a levelek teljesen kifehérednek (2. kép).



1. kép: A 150 mM-os NaCl fölösleggel kezelt algapopuláció részlete kétsejtes cönóbiákkal, keskeny sejtekkel (citometria során készített fénykép, 400-szoros nagyítás)



2. kép: A békálcse tenyészetek közti morfológiai különbségek

IV. Következtetések

1. Míg a kis békalencse számos életműködési paramétere a sóstresszre érzékenyebb, mint a réztoxicitásra, addig a *Scenedesmus opoliensis* zöldalga fokozottabb tűrőképességet mutat a magas NaCl-koncentrációval szemben, mint a víznek 25 μM Cu-ionnal történő szennyeződésének hatására. Ez a differenciált érzékenység megmutatkozik például a fotoszintetikus pigmenttartalom változásának mértékében és a biomassza-mennyiség csökkenésében.
 2. A fotoszintetikus fényenergia-hasznosítás maximális kvantumhatásfoka a békalencsénél a NaCl hatására erőbben csökken, mint a Cu-többlet hatására, míg az alga jól tolerálja mindkét stressztényezőt akkor, ha ezek külön-külön hatnak. A sóstressz és a réztoxicitás együttes jelenléte, egymás hatását multiplikatív módon felfokozva, mindkét növénytípus esetében megszünteti a fényenergiát hasznosító képességet.
 3. A fotoszintetikus pigmenttartalom csökkenése jó biokémiai indikátora a magas sókoncentráció és a réztöbblet iránti érzékenységnek. Míg az alga klorofill- és karotenoidtartalma a réztoxicitás hatására, addig a békalencsée a só-többlet következtében csökken számottevőbben. A sóstressz és a réztoxicitás együttes jelenléte additív módon eredményez erőteljes pigmenttartalom-csökkenést.
 4. A különböző fotoszintetikus pigmentek közötti mennyiségi arány erősen változik az algánál (pl. a sóstressz és a réztöbblet együttes alkalmazásakor a klorofill a/b arány erősen csökken, míg a klorofill/karotenoid arány nagymértékben emelkedik), de állandó szinten marad a békalencsénél.
 5. A 25 μM -os réztöbblet hatására a békalencse a normálnál nagyobb gyökeret fejleszt és tartalékainak felhasználásával, a kedvezőtlen hatás ellensúlyozására, felfokozza növekedésének ütemét, ami testtömeg-gyarapodásként észlelhető.
 6. A békalencse erősebb nátrium-akkumulációra képes, mint az alga, ugyanakkor a réztöbblet jelenlétében az alga Na-halmozása növekszik, míg a békalencsée csökken.
 7. Az algapopulációk egyedsűrűségének időbeni változását tekintve megállapítható, hogy a só-többlet enyhíti a réztöbblet osztódásgátló hatását. A békalencse esetében a
-

száraz biomassa mennyiséget a sóstressz alig befolyásolja, a réztöbblet növeli, a só- és réztöbblet együttes jelenléte pedig csökkenti.

8. A sóstressz és a réztoxicitás a vizsgált édesvízi zöldalga és a békalencse számos életműködési paramétereit lényegesen eltérő mértékben befolyásolja külön-külön és egymással társítottn alkalmazva. Az algánál a vízminőség só-többlet- és réz-többlet által előidézett változását legjobban tükröző paraméter a vizsgáltak közül a fotoszintetikus pigmentek közötti mennyiségi arányok változása, míg a békalencse esetében a fotoszintetikus fényhasznosítás határfoka tükrözi érzékenyebben a kedvezőtlen hatások mértékét. Magas sókoncentráció jelenlétében a békalencse nátrium-akkumulációs képessége kifejezettebb, ellenben az algáé réz-többlet hatására fokozódik, míg a békalencsée csökken.
-

Felhasznált irodalom

1. BARTELS, D., SUNKAR, R. (2005): Drought and salt tolerance in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58.
 2. DARZKIEWICZ, M., SKORZYNSKA-POLIT, E., KRUPA, Z. (2003): Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Science* 164: 195-202.
 3. HUANG, B. (2006): Plant-environment interactions, CRC Press, 121-128, 216-239.
 4. JENKS, M. A., HASEGAWA, P. M. (2006): Plants abiotic stress, Blackwell, 7-11.
 5. MADHAVA RAO, K. V., RAGHAVENDRA, A. S., JANARDHAN REDDY, K. (2006): Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants, Springer, 23-37.
 6. PARIDA, A. K., DAS, A. D. (2005): Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotoxicology and environmental safety* 60: 324-349.
 7. PORRA, R. J. (1991): Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae. In: Scheer, H.(ed.): Chlorophylls, CRC Press, Boca Raton, 31-57.
 8. PRAT, R. (1994): L' experimentation en physiologie végétale, Hermann, Paris, 316-330.
 9. RAI, A. K., TAKABE, T. (2006): Abiotic stress tolerance in plants, Springer, 121-133.
 10. SANCENON, V., PUIG, S., MATEU-ANDRES, I., DORCEY, E., THIELE, T. D., PENARRUBIA, L. (2004): The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development, *Biol. Chem.* 279: 15348-15355.
 11. TESTER, M., DAVENPORT, R. (2003): Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants, *Annals of Botany* 91: 503-527.
 12. WAHID, A., GHAZANFAR, A. (2006): Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane, *Journal of Plant Physiology* 163: 723-730.
 13. YOKOI, S., BRESSAN, A., HASEGAWA P. M. (2002): Salt stress tolerance of plants, Jircas working report, 25-33.
 14. YRUELA, I. (2005): Copper in plants, *Plant Physiology* 17(1): 145-156.
 15. ZHU, J.-K. (2003): Regulation of ion homeostasis under salt stress, *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445.
-