

Radosław KALINOWSKI*, Edyta CHRZANOWSKA, Marek BRYTAN

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Zakład Farmakologii i Toksykologii
ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa

* e-mail: rkalinowski@wihe.waw.pl, tel. 22 681-61-52

Oddziaływanie bojowych środków trujących na rośliny wyższe w teście Phytotoxkit

Związki fosforoorganiczne stanowią jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup substancji występujących w otoczeniu człowieka. Wśród nich wyróżnia się grupę wysoko-toksycznych estrów kwasów fosforowych o znaczeniu militarnym, tzw. bojowych środków trujących (BST). Z szacunków dokonanych w oparciu o scenariusze użycia BST wynika, że stężenia tych związków w środowisku glebowym mogą (bezpośrednio po zastosowaniu) osiągać wartości rzędu kilkuset mg/kg s.m. gleby. W pracy oceniono toksyczność wybranych fosforoorganicznych BST w stosunku do glebowych roślin wyższych: *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* i *Sinapis alba*. Badane związki nie wpłynęły znacząco na proces kiełkowania bioindykatorów. Wartości EC50-3d były wyższe niż 200 mg/kg s.m. gleby. Najwyższą toksyczność w stosunku do wczesnego wzrostu roślin (przyrost korzenia i łodygi) wykazywał związek VX i sarin, najniższą - soman. Spośród badanych roślin najwyższą wrażliwość na działanie związków fosforoorganicznych wykazywało *Sorghum saccharatum*. Stężenia somanu, sarinu i VX, wynoszące 12,5 mg/kg s.m. gleby, powodowały stymulację przyrostu łodygi u *Lepidium sativum*. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku związku VX i sarinu w stosunku do przyrostu korzenia u *Sinapis alba*. Zaobserwowano wyraźną stymulację wytwarzania chlorofilu przez *Sorghum saccharatum* w obecności sarinu i VX. Dla większości związków i roślin zaobserwowano przy niskich stężeniach zwiększoną zawartość chlorofilu a i b. Najwyższe przebadane stężenia (200 i 100 mg/kg s.m. gleby) z reguły wywoływały efekt odwrotny.

Słowa kluczowe: bojowe środki trujące, soman, sarin, VX, Phytotoxkit, chlorofil

Wstęp

Związki fosforoorganiczne stanowią jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup substancji występujących w otoczeniu człowieka. Są stosowane najczęściej na polach i w przydomowych ogródkach (insektycydy, herbicydy), ale także w przemyśle (przy produkcji tworzyw sztucznych, jako dodatki do paliw, smarów, płynów hydraulicznych), medycynie (w leczeniu jaskry) i weterynarii (leki przeciwpałozycydzne). Przedstawiciele tej grupy o najwyższej toksyczności, na przykład związek VX, soman, sarin i tabun, znajdują się w arsenałach armii państw posiadających broń chemiczną i zaliczane są do tzw. bojowych środków trujących (BST) o działaniu paralityczno-drgawkowym.

Pod względem budowy chemicznej są organicznymi pochodnymi kwasów zawierających atom fosforu i rodniki alkilowe lub alkoksylowe [1-3]. Fosforoorganiczne BST są dobrze rozpuszczalne w tłuszczach oraz umiarkowanie rozpuszczal-

ne w wodzie (przykładowo: soman - 2,1 g/100 g, VX - 5,0 g/100 g). W roztworach wodnych ulegają one powolnej hydrolizie, a silne zasady i związki chlorujące powodują ich szybki rozkład. Reaktywność związków fosforoorganicznych jest związana z elektrofilowym charakterem estrowego wiązania fosforu. Główny mechanizm działania toksycznego tych substancji to blokowanie kluczowego neuroprzekaźnika w organizmach żywych (głównie eukariotycznych) - acetylocholiny poprzez zablokowanie aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) i gromadzenie acetylocholiny w przestrzeniach międzysynaptycznych. Hamowanie aktywności AChE polega na wiązaniu się kowalencyjnym atomu fosforu należącego do inhibitora z centrum esterazowym enzymu, a następnie fosforylacji znajdującej się tam grupy hydroksylowej seryny. Związki fosforoorganiczne, w ogólności, są uważane za substancje łatwo biodegradowalne i niekumulujące się w organizmach żywych [4]. Jednakże istnieją liczne doniesienia literaturowe o stosunkowo trwałym nagromadzeniu tych substancji np. w nasionach roślin uprawnych czy produktach powstałych z ich przetworzenia [5-7]. Mogą one tym samym stanowić wtórne zagrożenie dla organizmów żywych.

W ocenie toksyczności związków chemicznych i próbek środowiskowych coraz większe zastosowanie mają gotowe zestawy typu Toxkit. Użyty w niniejszej pracy zestaw Phytotoxkit był z powodzeniem wykorzystywany zarówno do określania toksyczności próbek gleby [8], osadów dennych [9], kompostów [10], jak i pyłów czy osadów ściekowych z oczyszczalni [11].

Mając na uwadze bardzo wysoką toksyczność ostrą substancji z grupy fosforoorganicznych BST w stosunku do organizmów eukariotycznych, stałe zagrożenie terrorystyczne i wynikającą z niego potencjalną możliwość uwolnienia tych substancji do środowiska, a tym samym skażenia ekosystemów, oraz całkowity brak doniesień literaturowych dotyczących ekologicznych aspektów użycia broni chemicznej, za cel niniejszej pracy postawiono sobie określenie ekotoksyczności wybranych fosforoorganicznych BST w stosunku do glebowych organizmów roślinnych.

1. Materiały i metody

1.1. Badane związki

Do badań wykorzystano wybrane fosforoorganiczne bojowe środki trujące:

- soman (ester pinakolinowy kwasu metylofluorofosfonowego, CAS: 96-64-0),
- sarin (ester izopropylowy kwasu metylofluorofosfonowego, CAS: 107-44-8),
- VX (ester O-etyloS-2(diizopropylamino)etylowy kwasu metylotiofosfonowego, CAS: 50782-69-9),

wyprodukowane przez Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii (Warszawa), o czystości >99%. Roztwory podstawowe związków przygotowano w izopropanolu. Użyte w doświadczeniu stężenie rozpuszczalnika nie wywoływało obserwowalnych efektów u badanych organizmów.

1.2. Ocena fitotoksyczności

Test Phytotoxkit z zastosowaniem nasion *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* i *Sinapis alba* wykonano zgodnie z metodyką dostarczoną przez producenta testu - firmę Microbiotest (Belgia). Standardową glebę wg OECD zanieczyszczano związkami w stężeniach 12,5÷200 mg/kg s.m. (przy ilorazie postępu geometrycznego szeregu rozcieńczeń $q = 2$). Próby inkubowano w ciemności, przez 72 h, w temperaturze 25°C. Po tym czasie określono ilość kiełkujących nasion oraz z użyciem oprogramowania do cyfrowej analizy obrazu UTHSCSA ImageTool (ver. 3.0) dokonano pomiarów długości korzenia i łodygi.

1.3. Ocena zawartości chlorofilu a i b

Łodygi roślin po 72 h wroście w zanieczyszczonej glebie wyizolowano, zważono i przetrzymywano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia analiz zawartości chlorofilu a i b. Próbki roślin homogenizowano w 80% schłodzonym acetonie, następnie pozostawiono na 24 h w temperaturze 4°C. Zawartość chlorofilu oznaczono w oparciu o równania Humphreya i Jeffreya [12]:

$$\text{Chl a } [\mu\text{g/ml}] = -1,93 * A_{647} + 11,93 * A_{664}$$

$$\text{Chl b } [\mu\text{g/ml}] = 20,36 * A_{647} - 5,50 * A_{664}$$

gdzie A_{647} , A_{664} to wartości absorbancji prób przy zaznaczonych długościach fali. Zawartość chlorofilu a i b wyrażono w mg/g mokrej masy (m.m.) rośliny.

Wartości stężeń efektywnych obliczono metodą probitową, wartości NOEC (LOEC)-72h uzyskano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji i test Dunnetta. Wszystkie badania wykonano w 3 powtórzeniach. Prezentowane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z powtórzeń.

2. Wyniki badań

Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1-5. Najwyższe przebadane w teście stężenie - 200 mg/kg s.m. gleby powodowało ok. 30% inhibicję kiełkowania wszystkich roślin (tab. 1). Ten stosunkowo niski poziom inhibicji nie pozwolił na wyznaczenie wartości EC50-72h. Wyznaczone wartości NOEC-72h, czyli stężeń niewywołujących statystycznie obserwowalnych efektów w czasie trwania testu w stosunku do kiełkowania, wynoszą od 12,5 mg/kg s.m. dla somanu (*Lepidium sativum*) i VX (*Sinapis alba*) do 100 mg/kg s.m. dla sarinu (*Sinapis alba*) (tab. 2).

Toksyczność badanych związków w odniesieniu do wczesnego wzrostu roślin była zróżnicowana, wartości stężeń inhibicyjnych wahały się w zakresie od 30,7 mg/kg s.m. (sarin, przyrost łodygi u *Sorghum saccharatum*) do ponad 200 mg/kg s.m. (sarin, przyrost łodygi u *Lepidium sativum*) (tab. 3). Rośliny jednoliścienne reprezentowane w pracy przez sorgo wydają się być bardziej wrażliwe na działanie związków fosforoorganicznych niż dwuliścienne (wyraźnie niższe wartości IC50-72h, z wyjątkiem przyrostu korzenia w przypadku sarinu). Wartości IC50-72h dla *Sinapis alba* są zbliżone dla wszystkich związków i obu punktów końcowych testu (oprócz przyrostu korzenia w obecności sarinu).

Tabela 1

Wpływ BST na inhibicję kiełkowania roślin wyższych w teście Phytotoxkit

Stężenie mg/kg s.m.	Inhibicja kiełkowania, %								
	Soman			Sarin			VX		
	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>
200	26,67	36,67	23,33	26,67	36,67	16,67	33,67	36,67	36,67
100	20,00	30,00	13,33	20,00	23,33	10,00	16,67	23,33	30,00
50	6,67	20,00	6,67	10,00	13,33	3,33	10,00	13,33	20,00
25	0,00	16,67	0,00	3,33	6,67	0,00	3,33	6,67	10,00
12,5	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	6,67
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 2

Wartości NOEC-72h i LOEC-72h w stosunku do kiełkowania roślin wyższych w teście Phytotoxkit

	NOEC-72h/LOEC-72h mg/kg s.m.								
	Soman			Sarin			VX		
	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>
LOEC-72h	100	25	100	50	50	200	100	50	25
NOEC-72h	50	12,5	50	25	25	100	50	25	12,5

Tabela 3

Wartości stężeń inhibicyjnych IC50-72h w stosunku do wczesnego wzrostu roślin wyższych uzyskane w teście Phytotoxkit

Punkt końcowy testu	IC50-72h (95% przedział ufności) %								
	Soman			Sarin			VX		
	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>
Przyrost łodygi	67,5 (60,7÷74,3)	88,6 (82,7÷94,5)	89,9 (82,9÷96,9)	30,7 (27,6÷33,8)	>200	70,0 (67,0÷73,0)	37,6 (34,8÷40,4)	90,3 (84,3÷96,3)	68,1 (61,3÷74,9)
Przyrost korzenia	108,8 (102,9÷114,7)	103,3 (97,0÷109,6)	69,9 (62,9÷76,9)	42,1 (37,9÷46,3)	154,9 (149,4÷160,4)	111,1 (103,5÷118,7)	31,6 (29,0÷34,2)	70,9 (65,9÷75,9)	68,0 (61,4÷74,6)

Tabela 4

Zawartość chlorofili a i b w siewkach po 72 h wzroście w glebie zanieczyszczonej BST

Stężenie mg/kg s.m.	Zawartość chlorofilu (95% przedział ufności) mg/g m.m.																	
	Soman						Sarin						VX					
	<i>Sorghum saccharatum</i>		<i>Lepidium sativum</i>		<i>Sinapis alba</i>		<i>Sorghum saccharatum</i>		<i>Lepidium sativum</i>		<i>Sinapis alba</i>		<i>Sorghum saccharatum</i>		<i>Lepidium sativum</i>		<i>Sinapis alba</i>	
	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b	Chl a	Chl b
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
200	0,320 (0,305÷0,335)	0,561 (0,391÷0,737)	1,423* (1,175÷1,672)	1,597 (1,469÷1,726)	0,248 (0,203÷0,293)	0,328 (0,295÷0,361)	0,611* (0,579÷0,607)	0,754* (0,707÷0,801)	1,261* (1,135÷1,386)	1,776* (1,655÷1,897)	0,124* (0,091÷0,158)	0,133* (0,099÷0,167)	4,790* (4,413÷5,167)	6,126* (5,911÷6,340)	0,649* (0,592÷0,706)	1,414 (1,323÷1,505)	0,198 (0,164÷0,233)	0,612* (0,586÷0,638)

	0	12,5	25	50	100
	0,383 (0,352÷0,414)	0,298* (0,253÷0,343)	0,458 (0,375÷0,542)	0,450 (0,402÷0,499)	0,323 (0,191÷0,456)
	0,564 (0,391÷0,736)	0,336 (0,237÷0,435)	0,659 (0,545÷0,772)	0,494 (0,454÷0,534)	0,439 (0,237÷0,435)
	1,030 (0,949÷1,111)	1,524* (1,394÷1,654)	1,032 (0,917÷1,147)	1,377* (1,273÷1,482)	1,178 (1,055÷1,302)
	1,530 (1,432÷1,628)	2,083* (1,948÷2,217)	1,136* (0,753÷1,519)	1,423 (1,265÷1,581)	1,682 (1,495÷1,869)
	0,276 (0,223÷0,329)	0,237 (0,151÷0,323)	0,075* (0,001÷0,149)	0,121* (0,000÷0,273)	0,374 (0,160÷0,588)
	0,390 (0,286÷0,495)	0,288 (0,242÷0,333)	0,114* (0,000÷0,233)	0,210* (0,131÷0,289)	0,323 (0,120÷0,525)
	0,383 (0,352÷0,414)	0,578* (0,64÷0,791)	0,549* (0,514÷0,584)	0,633* (0,501÷0,766)	0,606* (0,532÷0,681)
	0,564 (0,391÷0,736)	0,747* (0,590÷0,904)	0,683 (0,666÷0,700)	0,890* (0,814÷0,964)	0,564 (0,415÷0,713)
	1,030 (0,949÷1,111)	0,851* (0,781÷0,920)	0,200* (0,008÷0,391)	0,476* (0,251÷0,701)	1,491* (1,319÷1,662)
	1,530 (1,432÷1,628)	0,966* (0,818÷1,115)	1,266* (1,164÷1,369)	1,566 (1,430÷1,701)	2,022* (1,864÷2,179)
	0,276 (0,223÷0,329)	0,092* (0,000÷0,205)	0,066* (0,000÷0,189)	0,091* (0,000÷0,192)	0,074* (0,000÷0,154)
	0,390* (0,286÷0,495)	0,105* (0,000÷0,275)	0,138* (0,011÷0,265)	0,076* (0,000÷0,177)	0,154* (0,022÷0,286)
	0,383 (0,352÷0,414)	0,487 (0,407÷0,568)	0,614* (0,467÷0,761)	0,839* (0,713÷0,965)	3,090* (2,986÷3,194)
	0,564 (0,391÷0,736)	0,745 (0,639÷0,849)	0,857 (0,709÷1,005)	1,243* (1,183÷1,302)	4,652* (4,455÷4,848)
	1,030 (0,949÷1,111)	0,933 (0,816÷1,049)	1,328* (1,200÷1,455)	1,213* (1,058÷1,369)	1,092 (0,901÷1,283)
	1,530 (1,432÷1,628)	1,471 (1,354÷1,587)	1,928* (1,819÷2,036)	1,837* (1,734÷1,941)	1,628 (1,494÷1,762)
	0,276 (0,223÷0,329)	0,491* (0,364÷0,618)	0,543* (0,471÷0,615)	0,406* (0,223÷0,589)	0,240 (0,114÷0,366)
	0,390 (0,286÷0,495)	0,526 (0,203÷0,848)	0,756* (0,606÷0,907)	0,609* (0,497÷0,721)	0,306 (0,265÷0,347)

* - statystycznie istotna ($p < 0,05$) różnica pomiędzy próbą a kontrolą

Tabela 5

Wartości stosunku Chl a/Chl b w siewkach po 72 h wzroście w glebie zanieczyszczonej BST

Stężenie [mg/kg s.m.]	Chl a / Chl b [-]								
	Soman			Sarin			VX		
	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Sorghum saccharatum</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sinapis alba</i>
200	0,58	0,89	0,75	0,81	0,71	0,93	0,78	0,46	0,33
100	0,74	0,70	1,16	1,08	0,74	0,47	0,66	0,67	0,79
50	0,91	0,97	0,56	0,71	0,30	1,43	0,67	0,66	0,67
25	0,70	0,92	0,79	0,80	0,16	0,43	0,72	0,69	0,72
12,5	0,89	0,73	0,83	0,77	0,88	0,99	0,65	0,64	0,98
0	0,69	0,67	0,71	0,69	0,67	0,71	0,69	0,67	0,71

Uzyskane wyniki wskazują na generalnie zwiększoną czułość przyrostu korzenia niż łodygi jako wskaźnika fitotoksycznego oddziaływania substancji organicznych. Stężenia somanu, sarinu i VX, wynoszące 12,5 mg/kg s.m. gleby, powodowały stymulację przyrostu łodygi u *Lepidium sativum*. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku związku VX i sarinu w stosunku do przyrostu korzenia u *Sinapis alba*.

Bojowe środki trujące wpływały na zawartość chlorofilu (tab. 4) w nadziemnych częściach roślin. W przypadku związku VX i *Sorghum saccharatum* zaobserwowano bardzo wyraźną zależność wzrostu stężenia chlorofili a i b w roślinie od dawki; podobną zależność, choć już nie tak silną, zaobserwowano również dla tej rośliny i sarinu. Dla większości związków i roślin odnotowano przy niskich stężeniach zwiększoną zawartość chlorofili a i b. Najwyższe przebadane stężenia z reguły wywoływały efekt odwrotny.

Wartości stosunku chlorofili a/b (tab. 5) kształtowały się w większości prób na podobnym jak w kontroli poziomie. W niektórych przypadkach (np. VX w stężeniu 200 mg/kg s.m. i *Sinapis alba*) wartość ta została obniżona przeszło 2-krotnie, co świadczy o wyraźnym ograniczeniu ilości chlorofilu a w porównaniu z chlorofilem b. W przypadku somanu i *Lepidium sativum* zaobserwowano wyższe wartości Chl a/Chl b, co wynika ze zwiększonej ilości chlorofilu a w próbkach.

3. Dyskusja

W światowej literaturze brak jest jakichkolwiek doniesień na temat oddziaływania BST na organizmy roślinne. Uzyskane wyniki można porównać jedynie do informacji dotyczących ekotoksyczności zbliżonej chemicznie grupy substancji - insektycydów fosforoorganicznych. Substancje te stosowane szeroko w uprawach na całym świecie wywołują u roślin efekty na różnych poziomach organizacji, od wzrostu całego organizmu, poprzez zaburzenia enzymatyczne, na zmianach w materiale genetycznym kończąc.

Autorzy [13] w badaniach fitotoksyczności dwu fosforoorganicznych insektycydów (fosfamidonu - CAS: 13171-21-6 i monokrotofosu - CAS: 6923-22-4) na wczesny wzrost pszenicy, kukurydzy i gorczycy wykazali wzrost zależności efekt-stężenie w stosunku do kiełkowania. W przypadku niskich stężeń monokrotofosu zauważalny był niewielki efekt stymulacji tego procesu. Równocześnie oba związki wywoływały pewne opóźnienie w czasie kiełkowania. Nastąpiło także ograniczenie przyrostu łodygi i korzenia w badanych roślinach. W przedłużonym, 30-dniowym, eksperymencie stwierdzono ponadto ograniczenie ilości liści i zawartości chlorofilu w roślinach eksponowanych na działanie insektycydów. U niektórych roślin pojawiły się także objawy chlorozy i nekrozy, występujące głównie w częściach brzegowych liści. Podobne objawy chlorozy zaobserwowali Matocha i Hopper [14] w 96-dniowych badaniach nad wpływem terubofosu (CAS: 13071-79-9) na rozwój kukurydzy w glebie o niskiej zawartości materii organicznej

(1,7%). Intensywne oznaki chlorozy były widoczne w zalecanej do stosowania w uprawach dawce pestycydu - 1,1 kg/ha. Autorzy informują także o blisko 50% ograniczeniu wzrostu roślin po 7 dniach trwania eksperymentu. W 21 i 42 dniu badań różnice wzrostu nie są już statystycznie istotne. Dodatkowo wskazują oni na prawdopodobne zahamowanie przez terubofos wchłaniania mikroelementów z gleby. Efekty użycia foratu (CAS: 298-02-2) na rozwój soi wykazali Saraswathi i in. [15]. Stężenie 100 ppm tego insektycydu powodowało stymulację kiełkowania i przyrostu korzenia w porównaniu z niezanieczyszczoną kontrolą. Związek ten spowodował także obniżenie zawartości cukrów redukujących, białek i tłuszczów w siewkach oraz aktywności enzymów z klas amylaz i lipaz. Autorzy stwierdzili również obniżenie zawartości chlorofilu b w roślinach. Na zmiany aktywności enzymatycznej w roślinach poddanych działaniu insektycydów fosforoorganicznych wskazują także Ganguly i in. [16]. W badaniach nad efektami profenfosu (CAS: 41198-08-7) i metylparationu (CAS: 63653-66-7) w groszku siewnym (*Lathyrus sativus*) wykazali, że aktywność esteraz obniżyła się po 72 h ekspozycji z poziomu 0,9 do 0,2 U/mg białka, aktywność peroksydaz wzrosła z poziomu 0,15 do 0,45 U/mg białka, a dysmutaz od 180 do 350 U/mg białka. Autorzy podkreślają również mutagenne działanie insektycydów mierzone m.in. indeksem mitotycznym. Dwumetoat (CAS: 60-51-5) w stężeniu 1,4 mg/kg m.m. liścia wywołał znaczną redukcję intensywności procesów fotosyntezy i transpiracji w szeroko rozpowszechnionej w krajach azjatyckich roślinie uprawnej - psiance podłużnej (*Solanum melongena*) [17]. Autorzy nie zaobserwowali jednak znaczącej degradacji chlorofilu i karotenoidów po 48 h od aplikacji związku.

Wczesny wzrost roślin w teście Phytotoxkit oceniany jest w warunkach całkowitego braku dostępu światła. Stąd też w niniejszej pracy uzyskano względnie niskie wartości stężeń chlorofili a i b oraz ok. 3-krotnie niższą wartość stosunku tych dwu pigmentów. Wynikać to może z nie w pełni rozwiniętego (u tak młodych siewek) aparatu fotosyntetycznego oraz wspomnianego wzrostu bez dostępu światła słonecznego. Dodatkowo (ze względu na masę dostępnego materiału badawczego) do analiz stężeń chlorofili użyto całości nadziemnej części rośliny, a nie tylko liści.

Lichtenthaler i in. [18] w badaniach nad zawartością chlorofili a i b u drzew (klon, buk, lipa i jodła) wykazali, że organizmy rosnące w miejscach zacienionych mają na ogół niższe stężenia barwników fotosyntetycznych niż rosnące w nasłonecznieniu. Dodatkowo autorzy wykazali obniżenie o blisko 1/3 stosunku Chl a/Chl b w przypadku ograniczonego dostępu światła słonecznego. Funkcje chlorofili związane z fotosyntezą u tych roślin przejmowały w większości karotenoidy. Amaya-Chavez i in. [19] stwierdzili podwyższenie wartości stosunku Chl a/Chl b u pałki szerokolistnej (*Typha latifolia*), eksponowanej na stężenie 6 mg/dm³ metylparationu, przy czym gatunek ten został wskazany jako efektywny w procesach bioremediacji związków fosforoorganicznych z wód i osadów dennych.

Wnioski

1. Fosforoorganiczne bojowe środki trujące w zróżnicowany sposób oddziałują na rośliny wyższe. W stężeniach powyżej 50 mg/kg s.m. gleby istotnie ograniczają kiełkowanie roślin jedno- i dwuliściennych, przy czym te pierwsze wydają się być bardziej wrażliwe na działanie związków fosforoorganicznych.
2. Niskie stężenia związków w glebie powodowały stymulację wzrostu łodygi i korzenia.
3. Uzyskane wyniki wskazują na większą czułość przyrostu korzenia niż łodygi jako wskaźnika fitotoksycznego oddziaływania BST.
4. Zaobserwowano wyraźną stymulację wytwarzania chlorofilu przez *Sorghum saccharatum* w obecności sarinu i VX. Szczegółowe wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.
5. Dla większości związków i roślin zaobserwowano przy niskich stężeniach zwiększoną zawartość chlorofili a i b. Najwyższe przebadane stężenia (200 i 100 mg/kg s.m. gleby) z reguły wywoływały efekt odwrotny.
6. Wartości stosunku chlorofili a/b kształtowały się w większości prób na zbliżonym jak w kontroli poziomie, niezależnie od stężenia badanej substancji toksycznej.

Literatura

- [1] Seńczuk W., Toksykologia współczesna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
- [2] Sidell F.R., Takafuji E.T., Franz D.R., Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, Textbook of Military Medicine, Washington 1997.
- [3] Romano J.A., Jr., Lukey B.J., Salem H., Chemical Warfare Agents Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics, CRC Press, Boca Raton 2008.
- [4] Manahan S.E., Toksykologia środowiska, WN PWN, Warszawa 2010.
- [5] Li L., Zhou Z., Pan C., Qian C., Jiang S., Liu F., Determination of organophosphorus pesticides in soybean oil, peanut oil and sesame oil by low-temperature extraction and GC-FPD, Chromatographia 2007, 66, 7-8, 625-629.
- [6] Salvador I.M., Frenich A.G., González F.J.E Vidal J.L.M., Determination of organophosphorus pesticides in vegetables by GC with pulsed flame-photometric detection, and confirmation by MS, Chromatographia 2006, 64, 1-12, 667-672.
- [7] Abo-Elghar G.E., Ei-Sheikh A.E., El-Sayed F.M., El-Maghraby H.M., El-Zun H.M., Persistence and residual activity of an organophosphate, pirimiphos-methyl, and three IGRs, hexaflumuron, teflubenzuron and pyriproxyfen, against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), Pest Management Science 60, 1, 95-102.
- [8] Blok C., Aguilera M., Van Os E.A., Validation of a new phytotoxicity test (Phytotoxkit) against an established four-week growing test with pre-grown plant plugs, Acta Horticulturae 2009, 819, 209-214.
- [9] Kalinowski R., Załęska-Radziwiłł M., Wyznaczanie standardów jakości osadów dennych na podstawie badań ekotoksykologicznych, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych 2009, 40, 549-560.
- [10] Oleszczuk P., The toxicity of composts from sewage sludges evaluated by the direct contact tests Phytotoxkit and Ostracodtoxkit, Waste Management 2008, 28, 9, 1645-1653.

- [11] Papadimitriou C.A., Haritou I., Samaras P., Zouboulis A.I., Evaluation of leaching and ecotoxicological properties of sewage sludge-fly ash mixtures, *Environmental Research* 2008, 106, 3, 340-348.
- [12] Humphrey G.F., Jeffrey S.W., Test of accuracy of spectrophotometric equations for the simultaneous determination of chlorophylls a, b, c1 and c2, [w:] Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright SW (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, UNESCO Publ., Paris 1997, 616-621.
- [13] Akhtar A., Akhtar M., Phytotoxic effect of organophosphate insecticides; phosphomidon and monocrotophos on wheat, maize and mustard, *Biosciences Biotechnology Research Asia* 2008, 5, 1, 325-330.
- [14] Matocha J., Hopper F., Influence of terbufos and nicosulfuron on iron chlorosis and growth of corn, *Journal of Plant Nutrition* 2001, 24, 9, 1445.
- [15] Saraswathi U., Jayapragasam M., Sulochana N., Effect of some pesticides on germinating soybean seeds, *Pestology* 1996, 20, 6, 10-15.
- [16] Ganguly S., Bhattacharya S., Mandi S., Tarafdar J., Biological detection and analysis of toxicity of organophosphate- and azadirachtin-based insecticides in *Lathyrus sativus* L., *Ecotoxicology* 2010, 19, 1, 85-95.
- [17] Mohapatra P.K., Khillar R., Hansdah B., Mohanty R.C., Photosynthetic and fluorescence response of *Solanum melangena* L. to field application of dimethoate, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010, 73, 78-83.
- [18] Lichtenthaler H.K., Ač A., Marek M.V., Kalina J., Urban O., Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species, *Plant Physiology and Biochemistry* 2007, 45, 8, 577-588.
- [19] Amaya-Chávez A., Martínez-Tabche L., López-López E., Galar-Martínez M., Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by *Typha latifolia* in water and artificial sediments, *Chemosphere* 2006, 63, 7, 1124-1129.

The Effect of Chemical Warfare Agents on Higher Plants in Phytotoxkit Test

Organophosphates are one of the most common group of substances occurring in the human environment. One of groups of these compounds are highly toxic esters of phosphoric acids, that are in the field of military interest - so called Chemical Warfare Agents (CWA). Based on possible use scenarios concentrations of these substances may reach hundreds of milligrams per kilogram of soil. This paper presents results of ecotoxicological assessment of selected organophosphate chemical warfare agents towards higher terrestrial plants: *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* and *Sinapis alba*. Tested chemicals did not influence significantly the germination of bioindicators' seeds. EC50-3d values were higher than 200 mg/kg d.w. soil. The highest toxicity toward early growth of plants (measured as root and stem elongation inhibition) was observed in VX and sarin treatment, the lowest in soman treatment. *Sorghum saccharatum* seems to be more sensitive to organophosphate influence than *Lepidium sativum* and *Sinapis alba*. All three tested substances in concentration of 12.5 mg/kg d.w. soil caused stimulation of stem elongation in *Lepidium sativum*. Similar effect was observed in VX and sarin influence on *Sinapis alba* root elongation. It was stated that high stimulation of chlorophyll synthesis in *Sorghum saccharatum* occurred after sarin and VX treatment. Most of tested organophosphates induced at low concentrations stimulation of chlorophyll a and b production in all plants. The highest tested amount of chemical warfare agents usually caused opposite effect.

Keywords: chemical warfare agents, soman, sarin, VX, Phytotoxkit, chlorophyll