

Barbara PAWŁOWSKA, Robert BICZAK

Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie
Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii
al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa
e-mail: r.biczak@ajd.czest.pl

Toksyczność czwartorzędowych soli amoniowych z anionem jodkowym: inhibicja wzrostu i zmiany zawartości barwników asymilacyjnych w roślinach

Od XX wieku obserwowane jest zjawisko uodparniania się niektórych gatunków chwastów na znane ludziom herbicydy. Dlatego niezmiernie ważne jest poszukiwanie nowych związków, które będą wykazywały selektywne lub totalne właściwości chwastobójcze. Do bardzo ciekawej grupy związków, które mogą posiadać takie właściwości, należą czwartorzędowe sole amoniowe, w tym ciecze jonowe, do których należą jodki tetrametyloamoniowy oraz tetrabutylamoniowy. W prezentowanej pracy przedstawiono wpływ jodku tetrametyloamoniowego [TMA][I] oraz jodku tetrabutylamoniowego [TBA][I], zastosowanych w eksperymencie wazonowym w formie doglebowej i dolistnej, na wzrost i rozwój popularnych w Polsce chwastów: żóltlicy drobnokwiatowej (*Galinsoga parviflora* Cav.), komosy białej - lebiody (*Chenopodium album* L.) i szczawiu zwyczajnego (*Rumex acetosa* L.). Zastosowanie badanych związków doglebowo spowodowało, że jedynie nasiona komosy białej w wazonach z dodatkiem [TMA][I] wykiełkowały, lecz wzrost roślin został zahamowany. Nasiona pozostałych chwastów wysiane do gleby z dodatkiem badanych związków w ogóle nie wykiełkowały. Fitotoksyczność jodków amoniowych zastosowanych w postaci oprysku uzależniona była od zastosowanego stężenia cieczy jonowej oraz od gatunku rośliny. Miało to swoje odzwierciedlenie w inhibicji wzrostu części nadziemnych roślin i korzeni, zmianach zawartości suchej masy i barwników fotosyntetycznych.

Słowa kluczowe: właściwości chwastobójcze, żóltlica drobnokwiatowa, szczaw zwyczajny, komosa biała, sucha masa, chlorofil, inhibicja wzrostu części nadziemnych roślin i korzeni

Wprowadzenie

Jednym z największych problemów pojawiających się w trakcie uprawy roślin jest niszczenie ich przez czynniki szkodliwe. Do takich czynników zaliczyć możemy m.in. chwasty. Ich niepożądany wpływ objawia się tym, że konkurują one z roślinami uprawnymi o składniki pokarmowe, wodę czy światło, mogąc nawet całkowicie je zagłuszyć. Chwasty mogą również powodować utrudnienia w zbiorze mechanicznym roślin, obniżają jakość plonu i opóźniają jego termin, powodując dodatkowe koszty związane z oczyszczaniem zbiorów z nasion i pozostałości chwastów. Chwasty są żywicielami groźnych dla roślin uprawnych chorób bakteryjnych, grzybowych, wirusowych czy szkodników, a niektóre z nich mogą być szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Większość chwastów produkuje duże ilości nasion,

które mają zdolność do długiego przebywania w stanie spoczynku i wzrostu w momencie, gdy pojawią się sprzyjające temu warunki. Cechuje je również bardzo szybki wzrost i łatwość w przystosowywaniu się do nowych warunków. Dużym problemem jest też zaobserwowany w ubiegłym wieku fakt, że pewne gatunki chwastów uodporniły się na znane herbicydy [1].

Jednymi z ważniejszych substancji używanych do zwalczania chwastów we współczesnych czasach są kwasy fenoksyoctowe, m.in. 2,4-D, MCPA czy 2,4,5-T. Dwa pierwsze dalej stosowane są w ochronie roślin, a MCPA uznaje się za jeden z tych herbicydów, względem którego nie obserwujemy zjawiska uodparniania się chwastów. W Polsce popularnymi herbicydami o działaniu selektywnym wobec roślin dwuliściennych są preparaty Aminopielik (s.a. kwas 2,4-D) i Chwastox, zawierający w swoim składzie MCPA, wykorzystywane w ochronie zbóż. Działają one jak syntetyczne auksyny (hormony roślinne), zaburzając prawidłowy rozwój roślin [2, 3]. Problem w stosowaniu tych preparatów stanowi jednak fakt, że związki te wykazują toksyczność w stosunku do zwierząt i ludzi. Substancje 2,4-D i MCPA wykazują działanie teratogenne i rakotwórcze oraz możliwość uszkodzenia wzroku [4, 5].

Z powyższych względów naukowcy na całym świecie kładą duży nacisk na poszukiwanie nowych związków organicznych wykazujących właściwości regulatorów wzrostu, jak również takich o totalnych lub selektywnych właściwościach herbicydowych, będących jednocześnie substancjami nieszkodliwymi dla ludzi i zwierząt.

Do takiej grupy związków, które posiadają bardzo ciekawe i pożądane właściwości, należą czwartorzędowe sole amoniowe (CSA). Czwartorzędowe sole amoniowe, przejawiając silne działanie biologiczne, są często stosowane w rolnictwie jako pestycydy, w medycynie wykorzystywane są do dezynfekcji sprzętu i pomieszczeń, a także do produkcji niektórych leków, szamponów itp. [6, 7]. Wyjątkowo interesującą grupą substancji chemicznych zaliczanych do CSA są ciecze jonowe (ILs). Ciecze jonowe to związki chemiczne zbudowane wyłącznie z jonów, a ich struktura może być dowolnie modelowana poprzez dobór odpowiedniego anionu lub kationu w zależności od oczekiwanych właściwości. Liczbę możliwych kombinacji szacuje się na 10^{18} , co spowodowało, że w ciągu ostatnich 20 lat ILs przyciągnęły szczególną uwagę świata nauki i przemysłu. Wyjątkowe właściwości cieczy jonowych, takie jak niska prężność par, niepalność, stabilność termiczna i elektrochemiczna, możliwość powtórnego wykorzystania, spowodowały zastosowanie tych soli w procesach (bio)katalizy, syntezy organicznej, elektrochemii, ekstrakcji i separacji itp. [8-15].

Do bardzo ciekawej grupy cieczy jonowych należą herbicydowe ciecze jonowe (*Herbicidal Ionic Liquids* - HILs), określane też mianem fitofarmaceutyków [16]. Związki te należą do cieczy jonowych trzeciej generacji, a ich budowę charakteryzuje fakt, że co najmniej jeden z jonów wykazuje aktywność herbicydową. Wykazują one lepsze właściwości biologiczne niż klasyczne, stosowane dotychczas, środki chwastobójcze. HILs posiadają bardzo dobrą stabilność termiczną i chemiczną, słabiej rozpuszczają się w wodzie, co zmniejsza możliwość skażenia wód

powierzchniowych i podziemnych. Kolejną korzyścią wynikającą ze stosowania HILs, w porównaniu do konwencjonalnych herbicydów, jest możliwość zmniejszenia dawki substancji aktywnej np. poprzez zmianę długości podstawnika, co znacznie podnosi bezpieczeństwo stosowanych preparatów i zmniejsza presję na środowisko naturalne oraz ekonomicznie uzasadnia stosowanie herbicydów w praktyce rolniczej [17-20].

Jednymi z przedstawicieli czwartorzędowych soli amoniowych są jodki tetrametyloamoniowy [TMA][I] i tetrabutylamoniowy [TBA][I]. Są to substancje stałe, dobrze rozpuszczalne w wodzie. Jodek tetrabutylamoniowy wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe [21]. Bardzo ważną cechą tych związków umożliwiającą ich szersze zastosowanie jest ich stosunkowo niska cena. Pomimo że związki te są znane od lat, to do tej pory niewiele wiadomo jest o ich wpływie na środowisko naturalne, w tym na rośliny wyższe.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu [TMA][I] oraz [TBA][I] na wzrost i rozwój popularnych w Polsce gatunków chwastów. Celem tego badania jest znalezienie nowych związków o selektywnych bądź totalnych właściwościach herbicydowych, które mogłyby stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych środków ochrony roślin, jak również właściwego zabezpieczenia i ochrony środowiska przed ich ewentualnym szkodliwym wpływem.

1. Materiały i metody

1.1. Związki chemiczne

Czwartorzędowe sole jonowe wykorzystane w badaniach: [TMA][I] (czystość: 99%), [TBA][I] (czystość: 98%) zakupione zostały w Sigma-Aldrich Chemical Co.

1.2. Badania toksyczności jodków amoniowych zastosowanych w formie oprysku roślin

Eksperyment wazonowy dotyczący oznaczenia potencjalnych właściwości chwastobójczych jodku tetrametyloamoniowego i jodku tetrabutylamoniowego został przeprowadzony w hali wegetacyjnej Zakładu Biochemii i Ekotoksykologii Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

Do plastikowych doniczek o średnicy 90 mm, zawierających 200 g gleby, wysiano jednakową ilość (określoną w sposób wagowy) nasion żóltlicy drobnokwiatowej (*Galinsoga parviflora* Cav.), komosy białej (*Chenopodium album* L.) i szczawiu zwyczajnego (*Rumex acetosa* L.). Glebą użytą w doświadczeniu był piasek gliniasty lekki o zawartości części spławialnych około 10%, węgla organicznego 0,9% i pH równym 6,0. Po 3 tygodniach od wschodów rośliny zostały opryskane roztworami badanych jodków. Związki te zostały użyte do oprysków w postaci roztworów wodnych w stężeniach: 0,5, 1,0 i 2,0%. W analogiczny sposób przygotowano również doniczki obiektu kontrolnego, które opryskano wodą destylowaną bez dodatku związków.

Badania prowadzone były przez 21 dni od momentu oprysku. Przez cały okres badań utrzymywano stałą wilgotność podłoża na poziomie wymaganym dla roślin (70% polowej pojemności wodnej), stałą temperaturę $20 \pm 2^\circ\text{C}$ i stałe natężenie oświetlenia równe 7000 lux w systemie 16 godz./dzień i 8 godz./noc.

Jako wskaźnik toksyczności jodków tetrametyloamoniowego i tetrabutylamoniowego posłużyła ocena wizualna zahamowania wzrostu, powstałych uszkodzeń czy usychania badanych gatunków chwastów, co zostało udokumentowane w postaci zdjęć cyfrowych przedstawionych w niniejszej pracy. Oznaczono również zawartość chlorofilu i karotenoidów w badanych roślinach oraz inhibicję wzrostu części nadziemnych roślin i ich korzeni.

1.3. Badania toksyczności doglebowej jodków amoniowych

Badania dotyczące określenia właściwości chwastobójczych soli jonowych użytych doglebowo przeprowadzono w hali wegetacyjnej przy zachowaniu identycznych warunków wilgotności podłoża, temperatury, natężenia i czasu oświetlenia, jakie opisano powyżej. Badania prowadzone były przez 28 dni. Badane związki dodano w postaci roztworów wodnych do gleby (inkorporacja) i na tak przygotowanym podłożu wysiano nasiona chwastów: żóltlicy drobnokwiatowej (*Galinsoga parviflora* Cav.), komosy białej (*Chenopodium album* L.) oraz szczawiu zwyczajnego (*Rumex acetosa* L.). [TMA][I] i [TBA][I] zastosowano w stężeniu 1000 mg/kg suchej masy gleby. Jako wskaźnik właściwości chwastobójczych badanych CSA posłużyła ocena wizualna, czego odzwierciedleniem są wykonane zdjęcia cyfrowe. Oznaczono również suchą masę roślin oraz inhibicję wzrostu części nadziemnych roślin i ich korzeni.

1.4. Oznaczanie zawartości barwników asymilacyjnych i suchej masy w roślinach

Zawartość barwników fotosyntetycznych oznaczano metodą spektrofotometryczną, zgodnie ze sposobem opisanym przez Orena i innych [22]. Zawartość chlorofilu a, chlorofilu b i karotenoidów oznaczono poprzez pomiar absorbancji przy długości fali: 470, 647 i 664 nm. Zawartość pigmentów fotosyntetycznych wyrażono w mg/g świeżej masy (św. m.).

Poziom suchej masy oznaczono metodą suszarkową - wagową [23], prowadząc suszenie około 1 g świeżej masy roślin w temp. 105°C do uzyskania stałej masy. Zawartość suchej masy podano w g/g św. m.

1.5. Analiza statystyczna

Wszystkie otrzymane w badaniach wyniki poddano analizie statystycznej. Do określenia istotności stwierdzonych różnic wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a wartości NIR przy poziomie ufności 0,95% obliczono testem Tukeya. Prezentowane w tabelach dane są średnią \pm odchylenie standardowe z 3 powtórzeń badań dla każdego stężenia związku.

2. Wyniki i dyskusja

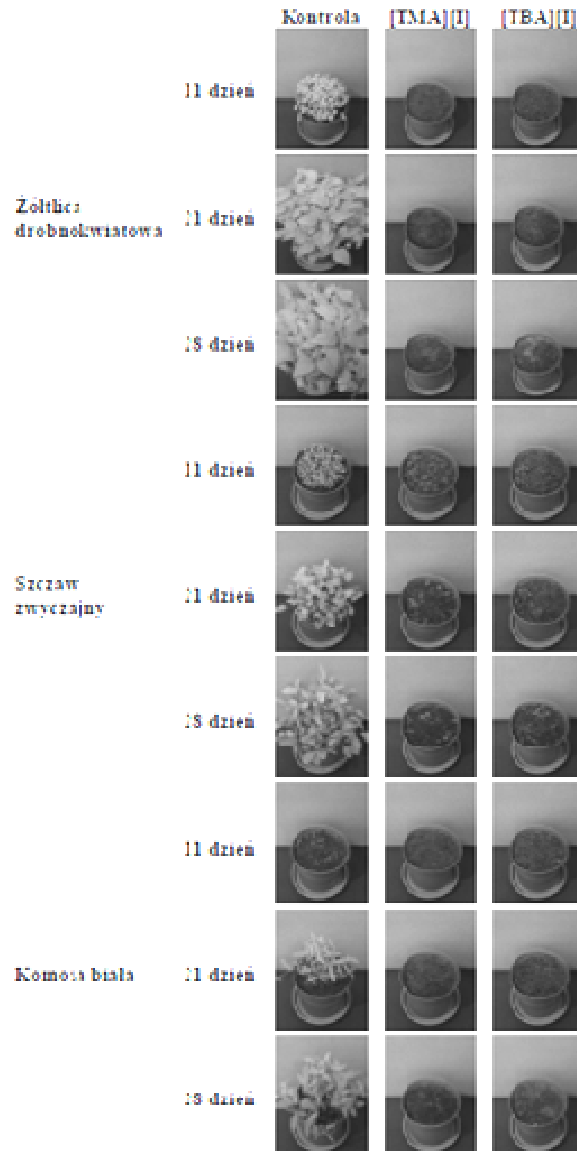
Uzyskane w omawianym eksperymencie wyniki badań dotyczących oddziaływania wybranych jodków amoniowych, zastosowanych w formie doglebowej i dolistnej, na wzrost i rozwój chwastów, wskazują, że badane substancje można uważać za związki charakteryzujące się selektywnym działaniem chwastobójczym. Na obserwowaną toksyczność dla roślin w największym stopniu miała wpływ forma zastosowanego zabiegu. Duże znaczenie miało również zastosowane stężenie związku w zabiegach dolistnych oraz gatunek rośliny.

Zarówno [TMA][I], jak i [TBA][I] zastosowane w formie doglebowej w stężeniu 1000 mg/kg s.m. gleby spowodowały, że na glebie z ich dodatkiem w ogóle nie wykiełkowały nasiona żóltlicy drobnokwiatowej, a wzrost pojedynczych roślin szczawiu zwyczajnego został zupełnie zahamowany. W przypadku zastosowania jodku tetrabutylamoniowego został również zahamowany wzrost roślin komosy białej. Jedynie na glebie z dodatkiem jodku tetrametylamoniowego nasiona komosy wykiełkowały, ale rośliny były bardzo małe, ze słabo rozwiniętymi liśćmi. W tym przypadku inhibicja wzrostu części nadziemnych roślin w stosunku do kontroli wyniosła 72%, natomiast inhibicja wzrostu korzeni również w stosunku do kontroli wyniosła 70% (rys. 1).

Słabsze i selektywne właściwości chwastobójcze badane związki wykazały w stosunku do chwastów po zastosowaniu tych substancji w formie oprysku. Rośliną najbardziej odporną na działanie [TMA][I] i [TBA][I], niezależnie od zastosowanego stężenia, okazała się żóltlica drobnokwiatowa. W jej przypadku praktycznie nie obserwowano ujemnego wpływu badanych związków na wzrost i wygląd roślin. Silniejsze negatywne działanie badane jodki wykazały w stosunku do szczawiu zwyczajnego, przy czym większy wpływ na wygląd i wzrost tej rośliny wykazał jodek tetrabutylamoniowy. Przy najniższym zastosowanym stężeniu obu jodków nie obserwowano żadnych widocznych zmian na roślinach szczawiu. Opryskanie szczawiu zwyczajnego roztworem [TBA][I] o stężeniu 1% powodowało już widoczną inhibicję wzrostu części nadziemnych roślin, a po ok. 21 dniach od oprysku liście roślin przybrały kolor czerwono-zielony. Jeszcze silniejsze działanie obserwowano po zastosowaniu [TBA][I] w stężeniu 2%. Rośliny po oprysku rosły bardzo wolno i praktycznie nie było różnicy w wielkości roślin pomiędzy 7 a 21 dniem od oprysku. Na liściach pojawiły się (ok. 4-7 dnia) białe plamki, część roślin uschła, a pozostałe po ok. 3 tygodniach od oprysku przyjęły barwę czerwoną. Zastosowanie [TMA][I] w stężeniu 1% powodowało pojawienie się drobnych białych plamek na liściach, natomiast przy stężeniu 2% poza białymi plamkami stwierdzono, że liście roślin są bardziej czerwone, niż to było można zaobserwować w przypadku kontroli (rys. 2).

Najsilniejsze działanie badane jodki amoniowe wykazały w stosunku do komosy białej i tutaj, podobnie jak w przypadku szczawiu, silniejsze działanie wykazywał [TBA][I]. W przypadku wszystkich zastosowanych stężeń obserwowano inhibicję wzrostu roślin. [TMA][I] i [TBA][I] w stężeniu 0,5% powodowały jedynie zahamowanie wzrostu części nadziemnych roślin, natomiast nie wywoływały zmian w ich

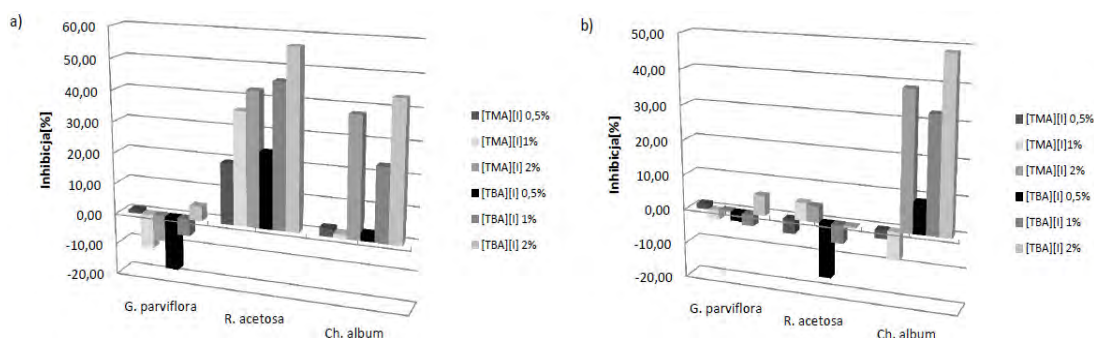
wyglądzie. Zastosowanie [TMA][I] w stężeniu 1% prowadziło do zasychania pojedynczych liści, natomiast pod wpływem TBA w tym samym stężeniu już po 7 dniach od oprysku pojawiły się widoczne zmiany na liściach, a po 21 dniach uschła około połowa roślin. Efektem oprysku 2% roztworami badanych jodków były zmiany pojawiające się na liściach roślin już tydzień po oprysku, a po upływie 21 dni od oprysku roztworem [TMA][I] i 11 dni od oprysku roztworem [TBA][I] większość roślin obumarła (rys. 2).



Rys. 1. Reakcja chwastów na doglebowe zastosowanie [TMA][I] i [TBA][I]

Fig. 1. Reaction of weeds to the soil application of [TMA][I] and [TBA][I]

wiu zwyczajnego i komosy białej (tab. 1). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że [TMA][I] w żadnym z zastosowanych stężeń nie wywołał istotnych zmian poziomu suchej masy u żółtlicy drobnokwiatowej i szczawiu zwyczajnego. Znaczny wzrost suchej masy obserwowano jedynie dla komosy białej przy zastosowaniu oprysku roztworem [TMA][I] w stężeniu 2%. Oprysk roztworami [TBA][I] w stężeniach 0,5 i 1% powodował niewielkie obniżenie zawartości suchej masy u żółtlicy drobnokwiatowej. Również w przypadku szczawiu zwyczajnego obserwowano spadek zawartości suchej masy i był on tym większy, im wyższe było stężenie [TBA][I] zastosowane do oprysku roślin. Widoczny, 50% wzrost suchej masy w stosunku do kontroli obserwujemy u komosy białej opryskanej 2% roztworem [TBA][I]. Oprysk roztworami [TBA][I] o stężeniach 0,5 i 1% nie wpływał na zawartość suchej masy komosy białej.



Rys. 3. Inhibicja wzrostu części nadziemnych roślin (a) i korzeni (b) po oprysku chwastów roztworami [TMA][I] i [TBA][I]

Fig. 3. Growth inhibition of (a) plant (b) roots after spraying weeds with solutions of [TMA][I] and [TBA][I]

Tabela 1. Zawartość suchej masy (mg/g św.m.) w roślinach żółtlicy drobnokwiatowej, szczawiu zwyczajnego i komosy białej po 21 dniach od oprysku 0,5, 1 i 2% roztworami [TMA][I] i [TBA][I] (średnia \pm odchylenie standardowe, n = 3)

Table 1. Variations in the dry weight (mg/g f.m.) for gallant soldier, common sorrel and white goosefoot 21 days after spraying solutions of 0.5, 1 and 2% [TMA][I] and [TBA][I] (mean \pm SD, n = 3)

		Kontrola	Stężenie związku			NIR _{0,05}
			0,5%	1%	2%	
Żółtlica drobnokwiatowa	[TMA][I]	0,1595 \pm 0,0021	0,1629 \pm 0,0148	0,1627 \pm 0,0048	0,1465 \pm 0,0095	0,0141
	[TBA][I]		0,1383 \pm 0,0106	0,1319 \pm 0,0054	0,1472 \pm 0,0088	0,0115
Szczaw zwyczajny	[TMA][I]	0,1701 \pm 0,0123	0,1727 \pm 0,0044	0,1662 \pm 0,0017	0,1833 \pm 0,0340	0,0281
	[TBA][I]		0,1558 \pm 0,0077	0,1522 \pm 0,0061	0,1452 \pm 0,0257	0,0232
Komosa biała	[TMA][I]	0,1601 \pm 0,0010	0,1617 \pm 0,0040	0,1527 \pm 0,0082	0,5421 \pm 0,0409	0,0323
	[TBA][I]		0,1595 \pm 0,0040	0,1657 \pm 0,0108	0,2409 \pm 0,0044	0,0095

Jednym z biomarkerów stresu roślin wywołanego przez szereg czynników abiotycznych, w tym również obecność cieczy jonowych w środowisku glebowym, jest zawartość barwników asymilacyjnych. Zawartość chlorofilu jest traktowana ponadto jako biochemiczny wskaźnik wpływu różnych substancji chemicznych na metabolizm roślinny. Z badań prowadzonych przez wielu autorów wynika, że związki chemiczne takie jak ILs mogą powodować uszkodzenia chlorofilu, co w konsekwencji powoduje zmniejszenie pochłaniania światła i zaburzenia w jego rozpraszaniu [14, 24, 25]. W konsekwencji taka sytuacja prowadzi do uszkodzenia obu fotosystemów PSI i PSII [14, 15, 26]. Niektórzy autorzy uważają ponadto, że zawartość chlorofilu jest doskonałym wskaźnikiem zdrowotności liści roślin [27, 28].

W prezentowanej pracy określono zmiany zawartości wszystkich barwników asymilacyjnych w liściach żóltlicy drobnokwiatowej, szczawiu zwyczajnego i komosy białej, opryskanych roztworami [TMA][I] i [TBA][I] o stężeniach: 0,5, 1 i 2% (tab. 2). We wszystkich roślinach eksperymentalnych zaobserwowano obniżenie się zawartości chlorofilu a i b, chlorofilu całkowitego (a+b) oraz karotenoidów pod wpływem oprysku roztworami [TMA][I] i [TBA][I]. Spadek poziomu tych barwników w liściach był tym większy, im wyższe zastosowano stężenie związku. Nie obserwowano natomiast zmian stosunku zawartości chlorofilu a do chlorofilu b. Również w przypadku zmian stosunku chlorofilu całkowitego do karotenoidów nie stwierdzono większych różnic. W przypadku zastosowania oprysku jodkiem tetrametyloamoniowym tylko przy najwyższym stężeniu (2%) obserwowano spadek stosunku chlorofilu całkowitego do karotenoidów, ale w przypadku wszystkich roślin wykorzystanych w eksperymencie nie był on większy niż 10% w stosunku do kontroli. Oprysk roztworami [TBA][I] jedynie w przypadku szczawiu zwyczajnego spowodował zmniejszenie się stosunku chlorofilu całkowitego do karotenoidów i był on liniowo skorelowany ze wzrostem stężenia związku.

Rezultaty uzyskane w eksperymencie wazonowym dowiodły, że jodek tetrametyloamoniowy oraz jodek tetrabutylamoniowy wykazują potencjalne właściwości chwastobójcze, a ich działanie zależne było w największym stopniu od sposobu zastosowania związku, ale również od zastosowanego stężenia i gatunku rośliny. Jodki amoniowe zastosowane dogłębowo wykazały bardzo silne działanie chwastobójcze, gdyż większość chwastów nie zdołała nawet wykiełkować, z wyjątkiem komosy białej w przypadku zastosowania [TMA][I]. Może to być związane z faktem, że związki te wykazują podobne działanie jak stosowane obecnie herbicydy dogłębowe, które pobierane razem z wodą i składnikami pokarmowymi wnikają do wschodzących kiełków, korzeni i części podziemnych przebijających się przez powierzchnię gleby w trakcie wschodów i zakłócają ich procesy życiowe [1].

Zastosowanie jodków tetrametyloamoniowego i tetrabutylamoniowego w postaci oprysków pokazuje, że ich działanie w bardzo dużym stopniu uzależnione było od gatunku roślin, na które zastosowano oprysk. Do podobnych wniosków doszli Biczak i inni [29], którzy w swoim eksperymencie wykazali selektywne właściwości chwastobójcze innej grupy CSA, a mianowicie tetrafluoroboranów.

Tabela 2. Zawartość barwników asymilacyjnych (mg/g św.m.) w liściach żóltlicy drobnokwiatowej, szczawiu zwyczajnego i komosy białej opryskanych 0,5, 1 i 2% roztworami [TMA][I] i [TBA][I] (średnia \pm odchylenie standardowe, n = 3)

Table 2. Changes in the content of assimilation pigments (mg/g f.m.) in gallant soldier, common sorrel and white goosefoot sprayed with solutions of [TMA][I] and [TBA][I] concentrations 0.5, 1 and 2% (mean \pm SD, n = 3)

			Stężenie związku				NIR _{0,05}
			Kontrola	0,5%	1%	2%	
[TMA][I]	Żóltlica drobnokwiatowa	Chl a	1,263 \pm 0,003	1,074 \pm 0,007	0,977 \pm 0,003	0,840 \pm 0,003	0,006
		Chl b	0,398 \pm 0,012	0,349 \pm 0,005	0,314 \pm 0,003	0,269 \pm 0,003	0,010
		Chl a+b	1,661 \pm 0,010	1,423 \pm 0,011	1,291 \pm 0,006	1,110 \pm 0,006	0,013
		Kar	0,331 \pm 0,007	0,291 \pm 0,002	0,260 \pm 0,002	0,246 \pm 0,001	0,006
		Chl a/Chl b	3,176 \pm 0,099	3,081 \pm 0,024	3,115 \pm 0,025	3,120 \pm 0,022	0,082
		Chl/Kar	5,018 \pm 0,129	4,893 \pm 0,052	4,959 \pm 0,054	4,502 \pm 0,014	0,115
	Szczaw zwyczajny	Chl a	0,889 \pm 0,003	0,916 \pm 0,006	0,858 \pm 0,003	0,802 \pm 0,008	0,008
		Chl b	0,319 \pm 0,001	0,303 \pm 0,002	0,290 \pm 0,008	0,281 \pm 0,006	0,008
		Chl a+b	1,207 \pm 0,002	1,219 \pm 0,007	1,148 \pm 0,008	1,084 \pm 0,012	0,013
		Kar	0,224 \pm 0,002	0,251 \pm 0,003	0,230	0,222 \pm 0,008	0,006
		Chl a/Chl b	2,786 \pm 0,022	3,017 \pm 0,020	2,964 \pm 0,082	2,854 \pm 0,048	0,077
		Chl/Kar	5,390 \pm 0,033	4,863 \pm 0,056	4,983 \pm 0,040	4,885 \pm 0,142	0,124
	Komosa biała	Chl a	1,404 \pm 0,008	1,405 \pm 0,003	1,135 \pm 0,003	–	0,010
		Chl b	0,407 \pm 0,012	0,389 \pm 0,002	0,319 \pm 0,002	–	0,013
		Chl a+b	1,806 \pm 0,011	1,792 \pm 0,004	1,455 \pm 0,003	–	0,013
		Kar	0,348 \pm 0,007	0,337 \pm 0,001	0,289 \pm 0,002	–	0,008
		Chl a/Chl b	3,466 \pm 0,081	3,615 \pm 0,010	3,553 \pm 0,007	–	0,087
		Chl/Kar	5,191 \pm 0,121	5,322 \pm 0,017	5,033 \pm 0,024	–	0,133
[TBA][I]	Żóltlica drobnokwiatowa	Chl a	1,263 \pm 0,003	1,173 \pm 0,031	1,020 \pm 0,048	0,983 \pm 0,020	0,047
		Chl b	0,398 \pm 0,012	0,367 \pm 0,011	0,333 \pm 0,014	0,309 \pm 0,007	0,018
		Chl a+b	1,661 \pm 0,010	1,540 \pm 0,043	1,353 \pm 0,062	1,292 \pm 0,027	0,062
		Kar	0,331 \pm 0,007	0,302 \pm 0,007	0,258 \pm 0,013	0,263 \pm 0,005	0,013
		Chl a/Chl b	3,176 \pm 0,099	3,195 \pm 0,014	3,061 \pm 0,025	3,177 \pm 0,024	0,081
		Chl/Kar	5,018 \pm 0,129	5,101 \pm 0,018	5,239 \pm 0,015	4,919 \pm 0,008	0,101
	Szczaw zwyczajny	Chl a	0,889 \pm 0,003	0,973 \pm 0,008	0,744 \pm 0,001	0,527 \pm 0,003	0,007
		Chl b	0,319 \pm 0,001	0,330 \pm 0,006	0,278 \pm 0,002	0,203 \pm 0,005	0,007
		Chl a+b	1,207 \pm 0,002	1,303 \pm 0,005	1,022 \pm 0,003	0,730 \pm 0,006	0,006
		Kar	0,224 \pm 0,002	0,257 \pm 0,004	0,214 \pm 0,003	0,167 \pm 0,014	0,012
		Chl a/Chl b	2,786 \pm 0,022	2,949 \pm 0,079	2,676 \pm 0,022	2,595 \pm 0,062	0,081
		Chl/Kar	5,390 \pm 0,033	5,072 \pm 0,076	4,781 \pm 0,078	4,393 \pm 0,351	0,284
	Komosa biała	Chl a	1,404 \pm 0,008	1,273 \pm 0,002	0,784 \pm 0,001	–	0,009
		Chl b	0,407 \pm 0,012	0,344 \pm 0,006	0,244 \pm 0,002	–	0,015
		Chl a+b	1,806 \pm 0,011	1,615 \pm 0,004	1,027 \pm 0,001	–	0,013
		Kar	0,348 \pm 0,007	0,293 \pm 0,001	0,212 \pm 0,002	–	0,008
		Chl a/Chl b	3,466 \pm 0,081	3,710 \pm 0,066	3,223 \pm 0,018	–	0,113
		Chl/Kar	5,191 \pm 0,121	5,510 \pm 0,038	4,852 \pm 0,041	–	0,142

Chl a - chlorofil a, Chl b - chlorofil b, Chl a+b - chlorofil a + chlorofil b, Kar - karotenoidy, Chl/Kar - chlorofil a+b/karotenoidy

Oddziaływanie toksyczne substancji chemicznych zastosowanych w formie oprysku uzależnione było w dużym stopniu również od stężenia związku zastosowanego w eksperymencie. Znajduje to potwierdzenie w dostępnej literaturze [12, 14, 29-32]. W pracach tych dowodzi się niemalże liniowej zależności pomiędzy toksycznością cieczy jonowych dla roślin a zastosowanym stężeniem związku. Takie silne korelacje obserwowane są zwłaszcza dla wysokich stężeń substancji, podczas gdy cieczy jonowe wprowadzone do podłoża w niewielkich stężeniach mogą działać podobnie jak sole nieorganiczne, a nawet hormony wzrostu roślin, powodując stymulację wzrostu i rozwoju roślin wyższych [12, 15, 24]. W omawianym badaniu nieznacznie silniejsze właściwości chwastobójcze wykazywał jodek tetrabutylamoniowy. Podobne wyniki w swoim eksperymencie uzyskali Biczak i inni [29, 33], którzy udowodnili, że toksyczność cieczy jonowych dla roślin wzrasta do długości łańcucha równej 3, 4 atomy węgla, a dalsze wydłużanie łańcucha węglowego w związkach powoduje już spadek fitotoksyczności. Rośliną odporną na zastosowane związki okazała się żółtlica drobnokwiatowa.

Analizując wpływ zastosowanych CSA na akumulację suchej masy w roślinach żółtlicy drobnokwiatowej, szczawiu zwyczajnego i komosy białej, zaobserwowano, że każda z tych roślin reaguje inaczej na wykonany zabieg. W przypadku zastosowania w postaci oprysku jodku tetrabutylamoniowego na żółtlicę drobnokwiatową i szczaw zwyczajny obserwowano spadek zawartości suchej masy, a wzrost tego parametru wystąpił jedynie w przypadku komosy białej przy zastosowaniu oprysku roztworem o stężeniu 2%. Do podobnych wniosków doszli Liu i inni [15], którzy, badając wpływ chlorku 1-butylo-3-metyloimidazoliowego na wzrost i rozwój roślin bobu, zaobserwowali wyraźne obniżenie się poziomu suchej masy w liściach. Odmienny wpływ na zawartość suchej masy u roślin miał jodek tetrametyloamoniowy, który spowodował istotny wzrost zawartości suchej masy jedynie w przypadku komosy białej, po zastosowaniu oprysku roztworem o stężeniu 2%, natomiast w pozostałych przypadkach nie obserwowano istotnych zmian w wartościach tego parametru. O wzroście poziomu suchej masy roślin po zastosowaniu ILs w wyższych stężeniach donoszą Biczak i inni [29-33].

Dokonując oceny wpływu zastosowanych QAS na chwasty, zbadano również zawartość barwników asymilacyjnych w roślinach. Po zastosowaniu tych związków w postaci oprysku we wszystkich roślinach eksperymentalnych zaobserwowano obniżenie się zawartości chlorofilu a, chlorofilu b, chlorofilu całkowitego (a+b) i karotenoidów w liściach w stosunku do roślin kontrolnych. O podobnym, systematycznym obniżaniu się poziomu barwników asymilacyjnych w glonach, rzęsie wodnej, liściach bobu, rzodkiewce zwyczajnej, siewkach pszenicy i jęczmienia jarego, wskutek zwiększania koncentracji cieczy jonowych w pożywkach, donoszą odpowiednio Ma i inni [35], Zhang i inni [36], Liu i inni [15], Wang i inni [25] oraz Biczak [33]. Obniżenie się zawartości chlorofilu w liściach jest związane głównie z zahamowaniem jego syntezy i uszkodzeniem membran chloroplastów wskutek peroksydacji lipidów.

Podsumowanie

Wyniki otrzymane w omawianym eksperymencie pozwalają stwierdzić, że zastosowane czwartorzędowe sole amoniowe, jodek tetrametyloamoniowy oraz jodek tetrabutylamoniowy, wykazują potencjalne właściwości chwastobójcze. Największy wpływ na właściwości chwastobójcze tych związków miała zastosowana forma zabiegu. Bardzo silny efekt wpływu związku na chwasty obserwowany był przy zabiegu doglebowym, w którym [TBA][I] zupełnie zahamował kiełkowanie nasion chwastów. Zastosowanie TMA[I] doglebowo całkowicie zahamowało wzrost żóltlicy drobnokwiatowej i szczawiu zwyczajnego oraz silnie ograniczyło wzrost komosy białej.

Wodne roztwory [TMA][I] oraz [TBA][I], zastosowane w formie oprysku na liście chwastów, wykazywały selektywne właściwości chwastobójcze. Najsilniejszy wpływ tych związków obserwowany był w przypadku komosy białej, gdzie oprysk 2% roztworami spowodował uschnięcie większości roślin. Szczaw zwyczajny opryskany roztworami badanych związków nie uschnął, natomiast widoczna była silna inhibicja wzrostu roślin, a na ich liściach pojawiły się zmiany w postaci białych plamek oraz zmiany barwy. Wszystkie te zmiany w przypadku obu tych roślin eksperymentalnych były silnie związane z zastosowanym stężeniem roztworów badanych związków. Wraz ze wzrostem stężenia badanych związków większy był stopień uszkodzenia roślin. Rośliną odporną na działanie badanych CSA okazała się żóltlica drobnokwiatowa, u której nie stwierdzono zewnętrznych objawów w następstwie przeprowadzonych zabiegów. Związkiem o silniejszych właściwościach herbicydowych okazał się jodek tetrabutylamoniowy. Wyniki uzyskane z obserwacji wyglądu roślin znalazły potwierdzenie w pomiarach długości części nadziemnych roślin i ich korzeni oraz w zawartości suchej masy. Zaobserwowano również praktycznie liniową zależność pomiędzy wzrostem stężenia CSA a spadkiem poziomu chlorofili i karotenoidów w badanych roślinach, co jest doskonałym odzwierciedleniem stanu zdrowia roślin. Pomimo braku zmian zewnętrznych analogiczne zmiany zawartości chlorofilu i karotenoidów zaobserwowano w przypadku żóltlicy drobnokwiatowej.

Zebrane w prezentowanych badaniach wyniki, dotyczące wpływu jodków tetrametyloamoniowego i tetrabutylamoniowego, zastosowanych w formie oprysku lub dodanych do gleby, na kiełkowanie i wzrost popularnych gatunków chwastów, mogą być przydatne do oceny ich toksyczności w stosunku do innych chwastów. Uzyskane dane mogą zostać również wykorzystane przy projektowaniu substancji o potencjalnych właściwościach chwastobójczych.

Literatura

- [1] Praczyk T., Skrzypczak G., *Herbicydy*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań 2004.
- [2] Grabińska-Sota E., Wiśniowska E., Kalka J., Toxicity of selected synthetic auxines - 2,4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants, *Crop Prot.* 2003, 22, 355-360.

- [3] Róžański L., Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku, AGRA-ENVIRO LAB, Poznań 1998.
- [4] Kimura O., Tsukagoshi K., Endo T., Uptake of phenoxyacetic acid derivatives into Caco-2 cells by the monocarboxylic acid transporters, *Toxicol. Lett.* 2009, 189, 102-109.
- [5] Panasiuk L., *Ostre zatrucia*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2010.
- [6] Pantani C., Spreti N., Maggutti M.C., Germani R., Acute toxicity of some synthetic cationic and surfactants to freshwater amphipod *Echinogammarus tibaldii*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1995, 55, 179-186.
- [7] Hossain M.I., El-Harawi M., Alitheen N.B.M., Noaman Y.A., Lévêque J.-M., Yin Ch.-Y., Synthesis and anti-microbial potencies of 1-(2-hydroxyethyl)-3-alkylimidazolium chloride ionic liquids: Microbial viabilities at different ionic liquids concentrations, *Ecotox. Environ. Saf.* 2013, 87, 65-69.
- [8] Grabińska-Sota E., Evaluation of impact of quaternary ammonium chlorides on water environment, Gliwice 2004.
- [9] Peric B., Sierra J., Martí E., Cruañas R., Garau M.A., A comparative study of the terrestrial ecotoxicity of selected protic and aprotic ionic liquids, *Chemosphere* 2014, 108, 418-425.
- [10] Pham T.P.T., Cho Ch.-W., Yun Y.-S., Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Res.* 2010, 44, 352-372.
- [11] Ventura S.P.M., Gonçalves A.M.M., Sintra T., Pereira J.L., Gonçalves F., Coutinho J.A.P., Designing ionic liquids: the chemical structure role in the toxicity, *Ecotoxicology* 2013, 22, 1-12.
- [12] Liu H., Zhang S., Hu X., Chen C., Phytotoxicity and oxidative stress effect of 1-octyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid on rice seedlings, *Environ. Pollut.* 2013, 181, 242-249.
- [13] Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Srček V.G., Grgas D., Dragičević T.L., Radojčić Redovniković I., Evaluation of toxicity and biodegradability of cholone chloride based deep eutectic solvents, *Ecotox. Environ. Saf.* 2015, 112, 46-53.
- [14] Cvjetko Bubalo M., Hanousek K., Radošević K., Srček V.G., Jakovljević T., Radojčić Redovniković I., Imidazolium based ionic liquids: Effect of different anions and alkyl chains lengths on the barley seedlings, *Ecotox. Environ. Saf.* 2014, 101, 116-123.
- [15] Liu T., Zhu L., Wang J., Wang J., Xie H., The genotoxic and cytotoxic effects of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride in soil on *Vicia faba* seedlings, *J. Hazard. Mater.* 2015, 285, 27-36.
- [16] Polít J.T., Praczyk T., Pernak J., Sobiech L., Jakubiak E., Skrzypczak G., Inhibition of germination and early growth of rape seed (*Brassica napus* L.) by MCPA in anionic and ester form, *Acta Physiol. Plant* 2014, 36, 699-711.
- [17] Cojocar O.A., Shamshina J.L., Gurau G., Syguda A., Praczyk T., Pernak J., Rogers R.D., Ionic liquid forms of the herbicide dicamba with increased efficacy and reduced volatility, *Green Chem.* 2013, 15, 2110-2120.
- [18] Pernak J., Niemczak M., Materna K., Marcinkowska K., Praczyk T., Ionic liquids as herbicides and plant regulators, *Tetrahedron* 2013, 69, 4665-4669.
- [19] Pernak J., Niemczak M., Zakrocka K., Praczyk T., Herbicidal ionic liquid with dual-function, *Tetrahedron* 2013, 69, 8132-8136.
- [20] Pernak J., Niemczak M., Materna K., Żelechowski K., Marcinkowska K., Praczyk T., Synthesis, properties and evaluation of biological activity of herbicidal ionic liquids with 4-(4-chloro-2-methylphenoxy)butanoate anion, *RSC Adv.* 2016, DOI: 10.1039/C5RA23997D.
- [21] Ingalsbe M.L., St. Denis J.D., McGahan M.E., Steiner W.W., Priefer R., Development of a novel expression, ZI_{MAX}/K_{ZI} , for determination of the counter-anion effect on the antimicrobial activity of tetrabutylammonium salts, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 4984-4987.
- [22] Oren R., Werk K.S., Buchmann N., Zimmermann R., Chlorophyll-nutrient relationships identify nutritionally caused decline in *Picea abies* stands, *Can. J. For. Res.* 1993, 23, 1187-1195.

- [23] Kowalska I., Zawartość wybranych składników szpinaku (*Spinacia oleraceae* L.) uprawianym przy zróżnicowanej zawartości wapnia, Roczniki AR w Poznaniu 2004, CCCLX, 105-110.
- [24] Liu T., Zhu L., Xie H., Wang J., Wang J., Sun F., Wang F., Effects of the ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate on the growth of wheat seedlings, Environ. Sci. Pollut. Res. 2014, 21, 3936-3945.
- [25] Wang L.-S., Wang L., Wang L., Wang G., Li Z.-H., Wang J.-J., Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings, Environ. Toxicol. 2009, 24, 296-303.
- [26] Tounekti T., Vadel A.M., Oñate M., Khmeira H., Munné-Bosch S., Salt-induced oxidative stress in rosemary plants: Damage or protection? Environ. Exp. Bot. 2011, 71, 298-305.
- [27] Islam M.K., Khanam M.S., Lee S.Y., Alam I., Huh M.R., The interaction of arsenic (As) and chromium (Cr) influences growth and antioxidant status in tossa jute (*Corchorus olitorius*), POJ 2014, 7, 499-509.
- [28] Hunsche M., Bürling K., Noga G., Spectral and time-resolved fluorescence signature of four weed species as affected by selected herbicides, Pestic. Biochem. Physiol. 2011, 101, 39-47.
- [29] Biczak R., Pawłowska B., Feder-Kubis J., The phytotoxicity of ionic liquids from natural pool of (-)-menthol with tetrafluoroborate anion, Environ. Sci. Pollut. Res. 2015, 22, 11740-11754.
- [30] Bałczewski P., Bachowska B., Białas T., Biczak R., Wieczorek W.M., Balińska A., Synthesis and phytotoxicity of new ionic liquids incorporating chiral cations and/or chiral anions, J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 1881-1892.
- [31] Biczak R., Bachowska B., Bałczewski P., Badanie fitotoksyczności cieczy jonowej chlorek 1-(metylo-tiometylo)-3-butyloimidazoliowy, Proc. ECOpole 2010, 4, 1, 105-113.
- [32] Pawłowska B., Biczak R., Bałczewski P., Phytotoxicity of 2,2'-thiodiacetic acid relative to selected higher plants, Inż. i Ochr. Środ. 2013, 16, 487-498.
- [33] Biczak R., Quaternary ammonium salts with tetrafluoroborate anion: Phytotoxicity and oxidative stress in terrestrial plants, J. Hazard. Matter. 2016, 304, 173-185.
- [34] Matzke M., Stolte S., Bösch A., Filser J., Mixture effects and predictability of combination effects of imidazolium based ionic liquids as well as imidazolium based ionic liquids and cadmium on terrestrial plants (*Triticum aestivum*) and limnic green algae (*Scenedesmus vacuolatus*), Green Chem. 2008, 10, 784-792.
- [35] Ma J.-M., Cai L.-L., Zhang B.-J., Hu L.-W., Li X.-Y., Wang J.-J., Acute toxicity and effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on green algae, Ecotox. Environ. Saf. 2010, 73, 1465-1469.
- [36] Zhang B., Li X., Chen D., Wang J., Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of Lemna minor, Protoplasma 2013, 250, 103-110.

Toxicity of Quaternary Ammonium Salts with Iodide Anion: Growth Inhibition and Changes in Pigments Assimilation in Plants

Since the nineteenth century it was witnessed the phenomenon of immunization of some weed species to herbicides known to man. Therefore it is extremely important to search for new compounds which exhibit a selective or total herbicidal properties. The very interesting group of compounds which may possess such properties include quaternary ammonium salts, including ionic liquids, which may include iodides, tetramethylammonium and tetrabutylammonium. The paper presents the impact of tetramethylammonium iodide [TMA][I] and tetrabutylammonium iodide [TBA][I] used in the pot experiment in the form of soil and foliar additions, on growth and development of weeds popular in Poland: gallant soldier (*Galinsoga parviflora* Cav.), white goosefoot (*Chenopodium album* L.) and common sorrel (*Rumex acetosa* L.). The compounds have been applied to the soil in concentration of 1000 mg/kg of dry weight of soil, and spray solutions were used at concentrations of 0.5, 1 and 2%. Application of tested compounds to the soil resulted in that only seeds of white

goosefoot in pots containing [TMA][I] germinated and the plant has grown, but there was a clear inhibitory effect of this compound. Seeds of other weeds sown on soil with the addition of test compounds did not germinate. Phytotoxicity of ammonium iodide used as a spray depended upon the concentration of the ionic liquid and the genetic traits of species and varieties of plants used in the experiment, which was reflected in the inhibition of the length of the plants and their roots, and the dry matter content. It marked also considered as the main biomarker of stress in plants the level of chlorophylls and carotenoids. In case of application both ammonium iodide showed a decrease in chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids, which was positively correlated with increasing concentration of compound. A stronger herbicidal effect was shown by tetrabutylammonium iodide. White goosefoot was found to be the most sensitive to the action of [TMA][I] and [TBA][I] and gallant soldier turned out to be practically resistant to these compounds.

Keywords: herbicidal properties, gallant soldier, common sorrel, white goosefoot, dry mass, chlorophyll, growth inhibition of roots and above-ground plant parts