

# Odpowiedź morfologiczno-biochemiczna rzęsy drobnej (*Lemna minor* L.) na działanie ciprofloksacyny

Sikorski Ł<sup>1</sup>, Adomas B. <sup>1\*</sup>, Nałęcz-Jawecki G. <sup>2</sup>, Piotrowicz-Cieślak A.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra Toksykologii Środowiska, Wydział Rolnictwa i Kształtowania Środowiska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>2</sup> Zakład Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup> Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

\*e-mail: badomas@uwm.edu.pl

## WSTĘP

Ciprofloksacyna (fluorochinolon) stosowana w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej w odróżnieniu od innych leków przeciwbakteryjnych, takich jak beta-laktamy, makrolidy, tetracykliny lub aminoglikozydy, działa intensywniej wobec drobnoustrojów. Substancje aktywne leków wykazują wysoką rozpuszczalność oraz niską biodegradację w środowisku. Niektóre z nich odznaczają się toksycznością ostrą dla organizmów wodnych w stężeniu poniżej 1mg/dm<sup>3</sup>, co zgodnie z dyrektywą UE 93/67/EEC klasyfikuje je do związków bardzo toksycznych. Dowiedzono, że substancje te występują nie tylko w ściekach szpitalnych (ciprofloksacyna 0,7-124,5 µg/l), wodach powierzchniowych, ale również rzekach i morzach w stężeniach przekraczających 1µg/l. W badaniach ważne jest poznanie działania farmaceutyków wobec organizmów innych, niż docelowe. Dowiedzono, że obecność farmaceutyków w środowisku nie pozostaje bez wpływu na roślinność wodną.

## MATERIAŁ I METODY

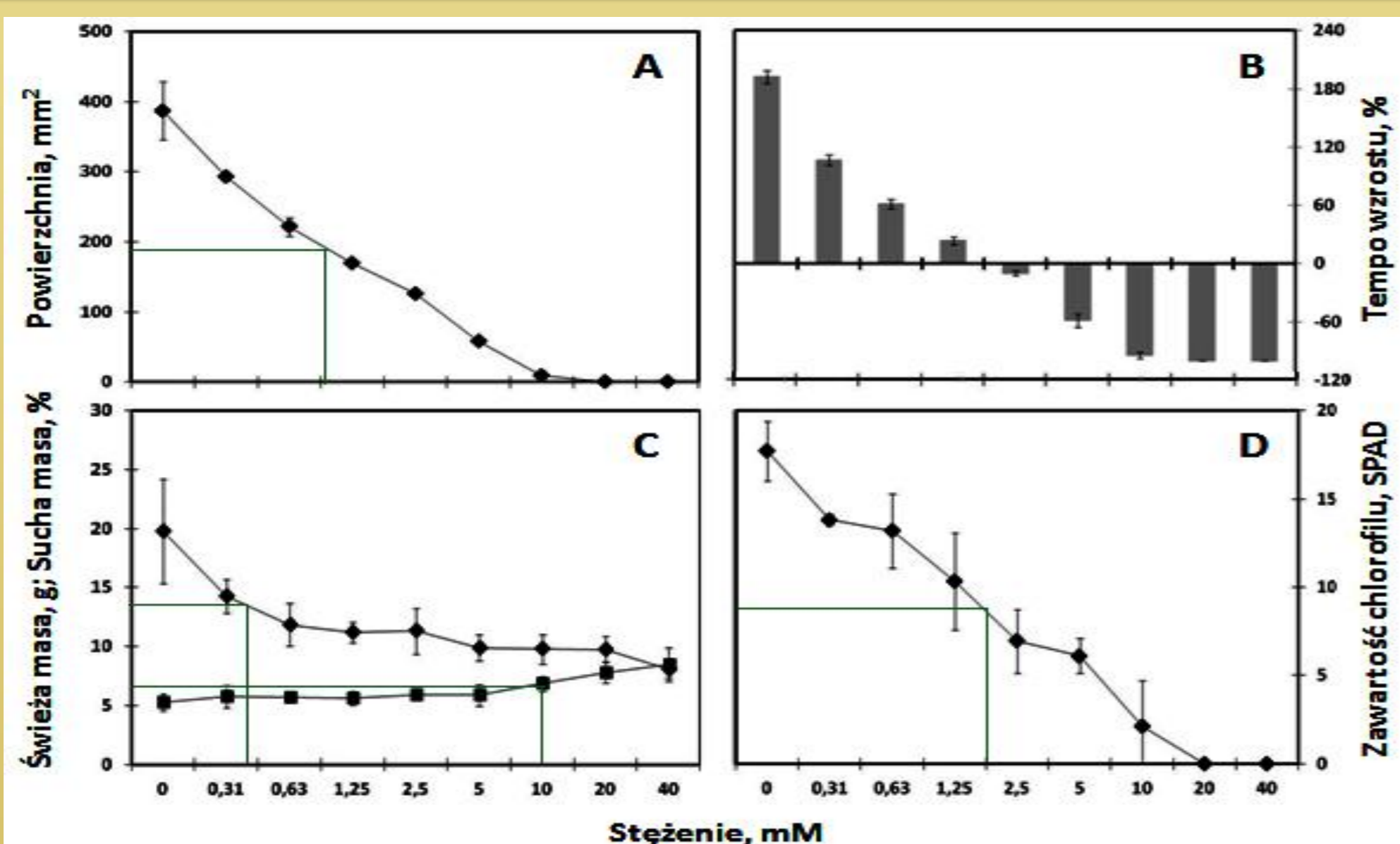
### Lemna Test

Rzęsa drobna (*Lemna minor* L.) rosła w 10 ml pożywki Steinberg'a (\*\*OECD, 221) z uwzględnieniem fotoperiodu 8/16 godzin w temperaturze 20°C w dzień i 16°C w nocy (140 µmol fotonów m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR). Cechy morfologiczne i biochemiczne rzęsy narażonej na różne ciprofloksacyny: 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 mM, oceniano po 7 dniach. Badano powierzchnię liści przy użyciu programu *ImageTool*, suchą i świeżą masę roślin ((EC) No 761/2009), zawartość chlorofilu chlorofilometrem SPAD-502

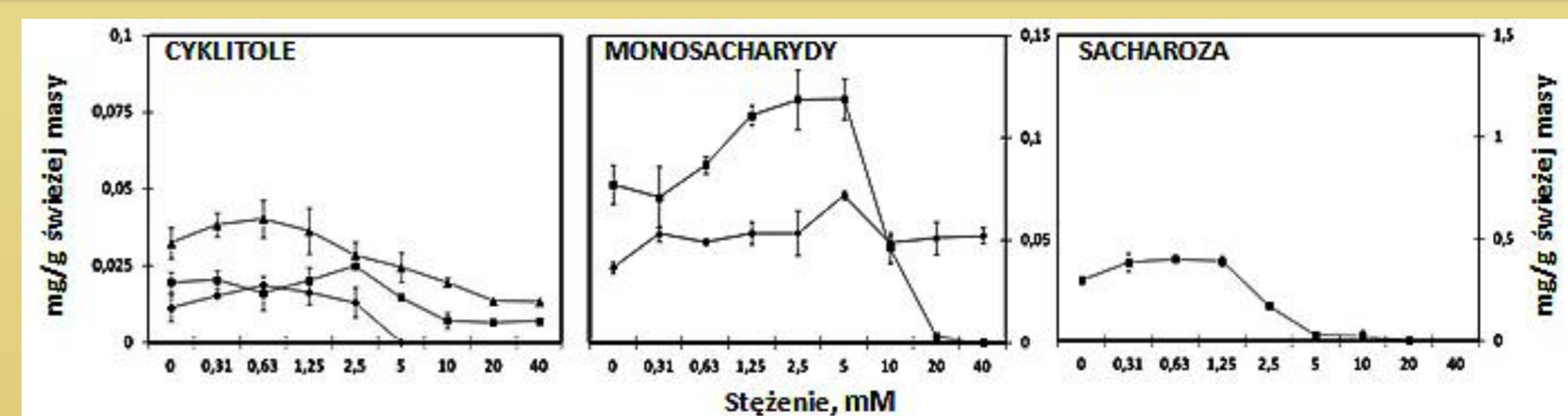
### Rozpuszczalne węglowodany

Zawartość węglowodanów rozpuszczalnych w tkankach rzęsy drobnej (*Lemna minor* L.) analizowano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii gazowej (GC), zgodnie z metodyką Piotrowicz-Cieślak (2005). Zawartość węglowodanów obliczona została na podstawie proporcji pików badanych próbek do pików standardu wewnętrznego. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe (± SD) dla 9 powtórzeń.

## WYNIKI



Rys. 1. Powierzchnia liści rzęsy drobnej (♦) rosnącej w wodzie zawierającej różne stężenia ciprofloksacyny od 0 do 40 mM panel - A; tempo wzrostu - B; świeża (♦) i sucha masa liści (■) - C; zawartość chlorofilu liści (♦) - D. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe (± SD) dla 9 powtórzeń. Linie zielone wyznaczają stężenie efektywne (EC<sub>50</sub>).

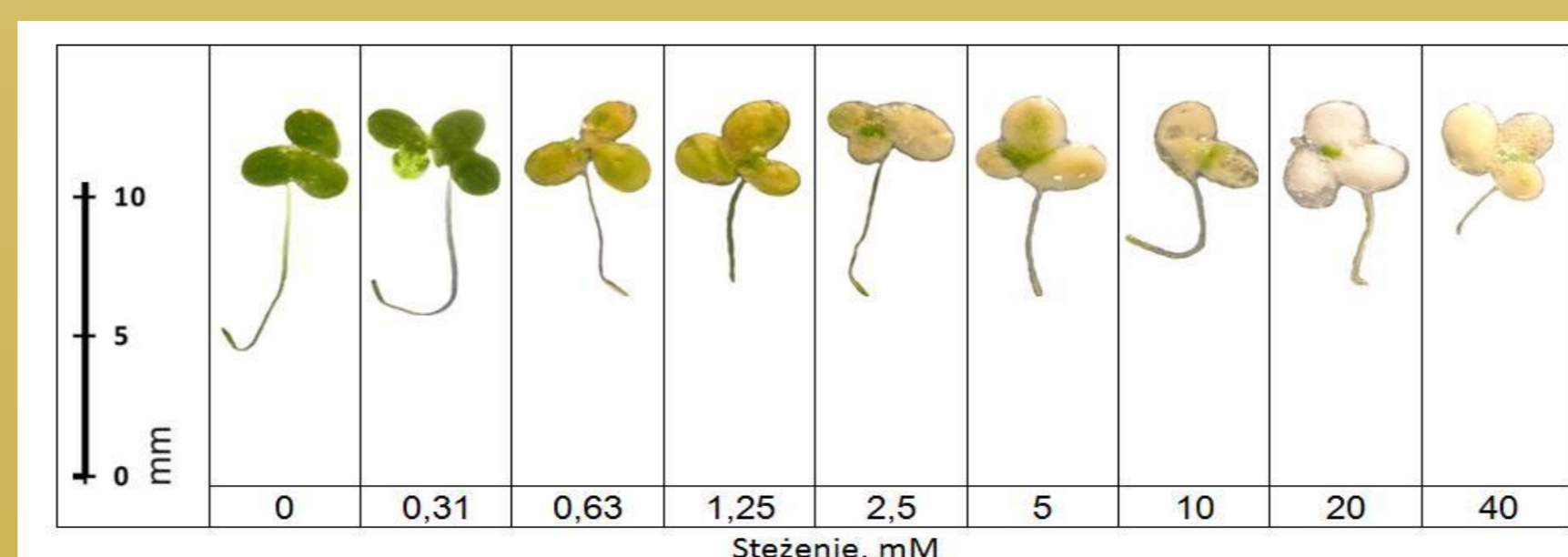


Rys. 2. Cyklitole (D-chiro-inozytol - ■, D-pinitol - ♦, myo-inozytol - ▲), monosacharydy (glukoza - ■, galaktoza - ♦) i sacharoza w tkankach rzęsy drobnej rosnącej w wodzie zawierającej różne stężenia ciprofloksacyny od 0 do 40 mM. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe (± SD) dla 9 powtórzeń.

Tab. 1. Galaktinol, rafinoza i werbaskoza w tkankach liści rzęsy drobnej rosnącej w wodzie zawierającej różne stężenia ciprofloksacyny od 0 do 40 mM

Cukry	CIPROFLOKSACYNA, mM								
	0	0,31	0,63	1,25	2,5	5	10	20	40
galaktinol	*	*	*	*	*				
rafinoza	*	*	*	*					
werbaskoza									

\* 0,5-1 mg/g ś.m., \*\* 1-5 mg/g ś.m., \*\*\* 5-10 mg/g ś.m.



Rys. 3. Rzęsa drobna (*Lemna minor* L.) rosnąca w wodzie zawierającej różne stężenia ciprofloksacyny po 7 dniach trwania testu.

Obecna w wodzie ciprofloksacyna wraz ze wzrostem stężeń zmniejszała powierzchnię liści i ich tempo wzrostu, świeżą masę, a także zawartość chlorofilu w tkankach rzęsy. Natomiast sucha masa rzęsy wraz ze wzrostem stężeń testowanego leku nieznacznie rosła. Stwierdzono, że powierzchnia liści rzęsy po 7 dniach badań była największa u roślin kontrolnych (389 mm<sup>2</sup>), zaś u roślin rosnących w wodzie o maksymalnej zawartości leku (40 mM) zmniejszyła się aż czterokrotnie. Tempo wzrostu rzęsy zostało zahamowane już przy stężeniu leku na poziomie 1,25 mM o 87%. Świeża masa rzęsy również istotnie malała i była o 63 % niższa u roślin rosnących w wodzie z najwyższym stężeniem ciprofloksacyny. Intensywność barwy zielonej rzęsy zmniejszała się wraz ze wzrostem stężeń leku, a przy dwóch najwyższych stężeniach (20 i 40 mM) badane wartości wyniosły 0 SPAD, bowiem liście rzęsy były całkowicie żółte. Fitotoksyczne dla rzęsy drobnej było stężenie ciprofloksacyny wynoszące 2,5 mM, które spowodowało zmniejszenie powierzchni fotosyntetycznej liści o 85%, w porównaniu z kontrolą. Cyklitole obejmujące myo-inozytol, D-chiro-inozytol oraz D-pinitol pod wpływem wzrastających stężeń leku malały. Nie stwierdzono w tkankach rzęsy obecności D-pinitolu od 5 mM ciprofloksacyny. Zawartość galaktozy rosła do 5 mM ciprofloksacyny, po czym gwałtownie malała. Natomiast zawartość glukozy utrzymywała się na stałym poziomie (około 0,05 mg/g ś.m.). Galaktinol obecny był w tkankach rzęsy do 2,5 mM leku, w wyższych stężeniach synteza galaktozylocyklitolu została zahamowana. Podobnie rafinoza, którą oznaczono w rzęsie narażonej na najniższe z testowanych stężeń. Zawartość cukrów była na bardzo niskim poziomie i nie przekraczała 1 % świeżej masy tkanek.

## WNIOSKI

Badania wykazały, że ciprofloksacyna ze wzrostem stężeń hamowała cechy morfologiczne rzęsy drobnej (*Lemna minor* L.). Analiza zawartości rozpuszczalnych węglowodanów dowiodła, że cukry nie tylko biorą udział w cyklach wzrostowych roślin oraz reakcjach molekularnych, a reagują także na czynniki środowiska m.in. suszę, temperaturę, stres oksydacyjny, ale także na zanieczyszczenie środowiska lekami.

Na podstawie ocenionych cech morfologicznych i biochemicznych stwierdzono, że rzęsa drobna (*Lemna minor* L.) jest bardzo dobrym fitoindykatorem zbiorników słodkowodnych zanieczyszczonych ciprofloksacyną.