

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola



A króm (VI) hatása békalencse-fajok axenikus tenyészeinek növekedési jellemzőire és fotoszintetikus aktivitására

doktori (PhD) értekezés

OLÁH VIKTOR

Témavezetők:

Dr. habil. Mészáros Ilona tanszékvezető egyetemi docens
Dr. habil. Lakatos Gyula tanszékvezető egyetemi docens

Debrecen,
2009.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Környezetanalitikai és Alkalmazott Ökológiai programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2009.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy, Oláh Viktor doktorjelölt 2004 - 2007. között a fent megnevezett Doktori Iskola Környezetanalitikai és Alkalmazott Ökológiai programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2009.

.....
a témavezető aláírása

Tanúsítom, hogy, Oláh Viktor doktorjelölt 2004 - 2007. között a fent megnevezett Doktori Iskola Környezetanalitikai és Alkalmazott Ökológiai programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2009.

.....
a témavezető aláírása

A KRÓM (VI) HATÁSA BÉKALENCSE-FÉLÉK AXENIKUS TENYÉSZETEINEK
NÖVEKEDÉSI JELLEMZŐIRE ÉS FOTOSZINTETIKUS AKTIVITÁSÁRA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Környezettudomány tudományágban

Írta: Oláh Viktor okleveles környezetkutató

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája
(Környezetanalitikai és Alkalmazott Ökológiai programja) keretében

Témavezető: Dr. Mészáros Ilona

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 20... ..

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20... ..

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	3
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	5
2.1. Króm a környezetben.....	5
2.1.1. A króm felvétele a növényekben	7
2.1.2. A króm(VI) viselkedése a növényi sejtben.....	7
2.1.3. A króm(VI) hatásai az élő sejtben	9
2.1.4. Védekező mechanizmusok és a krómtolerancia	11
2.2. Fitotoxikológiai tesztek	14
2.2.1. Biomarkerek felhasználása	15
2.2.2. A békalencse-fajok alkalmazása ökotoxikológiai tesztekben.....	16
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	20
3.1. A tesztnövények	20
3.1.1. A törzstenyészetek létrehozása és fenntartása	21
3.2. Az ökotoxikológiai tesztek összeállítása és kivitelezése	23
3.2.1. A rövid-távú tesztek körülményei és a mért paraméterek	23
3.2.2. A hosszú-távú tesztek körülményei.....	27
3.2.3. A <i>S. polyrrhiza</i> ökotípusok vizsgálata során alkalmazott további módszerek	29
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	31
4.1. A króm(VI) hatása a békalencse-fajok növekedésére és fotoszintézis aktivitására	31
4.1.1. A növekedési paraméterek változása a hosszú-távú tesztekben	31
4.1.2. A klorofill fluoreszcencia paraméterek változása a rövid-távú tesztekben.....	37
4.1.3. A fotoszintetikus pigmenttartalom változásai	48
4.2. Az antociánok lehetséges szerepének vizsgálata különböző <i>S. polyrrhiza</i> ökotípusok Cr(VI)-toleranciájában	53
4.2.1. Az ökotípusok növekedési paraméterei	53
4.2.2. Az antocián-tartalom változása	59
4.2.3. A két ökotípus oxidatív stressz-toleranciájának vizsgálata	64
5. ÖSSZEFOGLALÁS	67
5.1. A három vizsgált békalencse-faj kromátérzékenységének összehasonlítása	67
5.2. Az ökotoxikológiai tesztekben általunk vizsgált növekedési és fiziológiai jellemzők érzékenységének az összehasonlítása	68

5.3. Az eltérő antocián-felhalmozó képességű <i>S. polyrrhiza</i> ökotípusok vizsgálata és Cr(VI) érzékenysége	69
5.4. A <i>S. polyrrhiza</i> antocián-felhalmozásának, mint potenciális biomarkernek az alkalmazhatósága	70
5.5. Az eredmények gyakorlati szempontból való alkalmazhatósága	70
6. SUMMARY	72
6.1. Introduction and aims of study	72
6.2. Materials and Methods	73
6.2.1. Conditions of long-term chromate exposures	73
6.2.2. Conditions of short-term chromate exposures	74
6.2.3. Data evaluation	75
6.3. New scientific results	76
6.3.1. Differences in sensitivity of the tested duckweed species to Cr(VI) treatments	76
6.3.2. Differences in sensitivity of the measured parameters to Cr(VI) treatments	76
6.3.3. Differences in growth and anthocyanin accumulating capacity of <i>S. polyrrhiza</i> ecotypes and their responses to Cr(VI)	77
6.3.4. Testing the applicability of anthocyanin accumulation as potential biomarker in <i>S. polyrrhiza</i>	78
6.3.5. Implementation of the most important results in practice	78
7. IRODALOMJEGYZÉK	80
8. FÜGGELÉK	92
Rövidítés- és fogalommagyarázat	92
A jelölt tudományos tevékenysége	95

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az emberi tevékenységek során környezetünkbe kerülő különböző anyagok mennyisége folyamatosan nő. Ezek egy része az élővilágra potenciálisan veszélyesnek tekinthető, másokról pedig az egyre részletesebb kutatások alapján sem tudható, hogy pontosan milyen hatásuk van. További nehézséget okoz a természeti környezet többszörösen összetett volta, mely bonyolulttá teszi az egyes hatásoknak és azok okozóinak feltárását.

A krómot az emberiség régóta és nagy mennyiségekben használja különböző tevékenységei során, és ennek révén nagy mennyiségben kerülhet szennyezőanyagként a környezetbe, ahol bekerülve a biogeokémiai ciklusokba az élőlényekre is veszélyt jelent (Appenroth et al. 2000, Kaszický et al. 2005, Keresztúri et al. 2006). Veszélyessége ellenére a króm viselkedése az élő sejtben, illetve élettani hatásai a többi nehézfémhez képest még mindig kevésbé ismertek (Cervantes et al. 2001, Kaszický et al. 2005, Appenroth et al. 2008). A króm oxidációs állapota 0 és 6+ között változhat, a különböző formák viszonylag könnyen egymásba alakulnak. Stabilnak a Cr(III) és Cr(VI) formák tekinthetők (Hörtsik et al. 2007). A Cr(VI) mérgező hatása sokszorosan nagyobb a Cr(III)-nál. A jelenlegi ismeretek szerint a Cr(VI) kromát ionként, a szulfátranszport rendszeren keresztül jut be a növényi sejtbe, ahol elsősorban oxidáló ágensként, illetve közvetve az elektron transzport rendszer befolyásolásával okoz oxidatív károsodást (Panda és Choudhury 2005, Sinha et al. 2005). Specifikus króm (VI)-rezisztencia mechanizmusok jelenleg nem ismertek a hajtásos növényekben, a kromát-stressz kivédésében elsősorban az enzimátikus és nem enzimátikus antioxidánsok játszanak szerepet (Cervantes et al. 2001).

A vizeinket napjainkban érő antropogén terhelések, ezen belül is különösen a nehézfém- és peszticidszennyezések hatásainak feltárásában nagy segítséget nyújtanak az ökotoxikológiai tesztek. Segítségükkel feltárható az egyes anyagok viselkedése a természetben és a biológiai rendszerek ezekre adott válaszai (Schauber et al. 1995). Egyre nagyobb az igény az érzékenyebb, illetve a nem destruktív eljárások bevezetésére és az erre alkalmas mérőrendszerek kialakítására. Folyamatosan kutatott téma az egyes természeti környezetbe kerülő kemikáliák potenciális hatása is az élő szervezetekre, illetve az emberre.

Az ökotoxikológiai tesztekben az ideális teszt-szervezetnek több szempontnak meg kell felelnie. Fontos az élőlény gyakori és tömeges megjelenése a természetben, a hosszú élettartama, illetve a gyors növekedése. A szennyezőanyagokra is érzékenyeknek kell lenniük, és a laboratóriumban való tarthatóság is meghatározó (Ferrat et al. 2003). A (nem algákkal végzett) vízi ökotoxikológiai teszt-rendszerek egyik leggyakrabban alkalmazott teszt-szervezetei a békalencse-fajok (Lemnoidae, Araceae, korábban Lemnaceae). A békalencse-fajok a természetes felszíni vizek fontos primer producensei.

Gyorsan, főleg vegetatív módon szaporodnak, könnyen terjednek, alkalmazkodóképességük jó, így világszerte elterjedt fajok, amelyek legtöbbje kozmopolitának tekinthető (Crawford és Landolt 1993). Kis méretük, aszeptikus körülmények közt való könnyű nevelhetőségük és gyors szaporodásuk alkalmassá teszi őket a mérgező anyagok hatásainak tanulmányozására. Külön előnyük, hogy mivel a gyökérzetük nem, vagy csak kevésbé vesz részt a tápanyagfelvételben, a vizsgált anyagok közvetlenül a hajtásrészben kerülnek felvételre (Environment Canada 1999), így a xenobiotikumok fiziológiai hatásainak vizsgálatához különösen alkalmas modell-szervezetek (Environment Canada 1999).

Az értekezés célkitűzései:

- Három, Magyarország vizeiben általánosan elterjedt békalencse-faj, a *Lemna gibba* L., *Lemna minor* L., és a *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden akut és krónikus kromátkezeléssel szembeni toleranciájának az összehasonlítása, fiziológiai illetve növekedési paraméterek alapján.
- A békalencse-tesztekben a kromát toxicitásának jellemzésére általunk alkalmazott paraméterek érzékenységének az összehasonlítása.
- A *S. polyrrhiza* esetében az antocián-felhalmozás ökotípusok szerinti eltéréseinek tanulmányozása.
- A *S. polyrrhiza* antocián-felhalmozó képességének króm(VI)-stressz, illetve más stresszhatások esetén biomarkerként való alkalmazhatóságának a vizsgálata.
- A *S. polyrrhiza* antocián-felhalmozásának laboratóriumi vizsgálatára egy rutinszerűen használható, egyszerű módszer kidolgozása.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. Króm a környezetben

Az ember által alkalmazott kemikáliák közvetlenül vagy közvetve megjelenhetnek a környezetben és jelenlétükkel, hatásukkal terhelik azt. Mivel ezek széleskörű alkalmazása előreláthatóan továbbra is növekedni fog, hosszabb távon továbbra is számolni kell potenciális környezetterhelésükkel. Ebből következően a lehető legtöbb információt kell szereznünk arról, hogy ezek az anyagok a környezetben miként viselkednek.

A nehézfémeket az ember egyre nagyobb mennyiségben használja és juttatja ki a természetbe, ahol azok az élőlényekbe kerülve akkumulálódhatnak, illetve a koncentrációtól és egyéb körülményektől függően akut vagy krónikus mérgezést okozhatnak. Emiatt a nehézfémek az ökotoxikológiai és környezetszisztási kutatások egyik kiemelt területét képezik (Shanker et al. 2005).

A króm (Cr) a periódusos rendszer 21. eleme. Relatív atomtömege 51,996 g. A Földön a 6. legnagyobb gyakoriságú elem (Sinha et al. 2005). Oxidációs állapota 0 és 6+ között változhat, a különböző formák viszonylag könnyen egymásba alakulnak. Ezek közül stabilnak a Cr(III) és Cr(VI) formát tekintik, míg a többi formája az oxidációs és redukciós folyamatok átmeneti terméke (Appenroth et al. 2000, Keresztúri et al. 2006, Hörcsik et al. 2007).

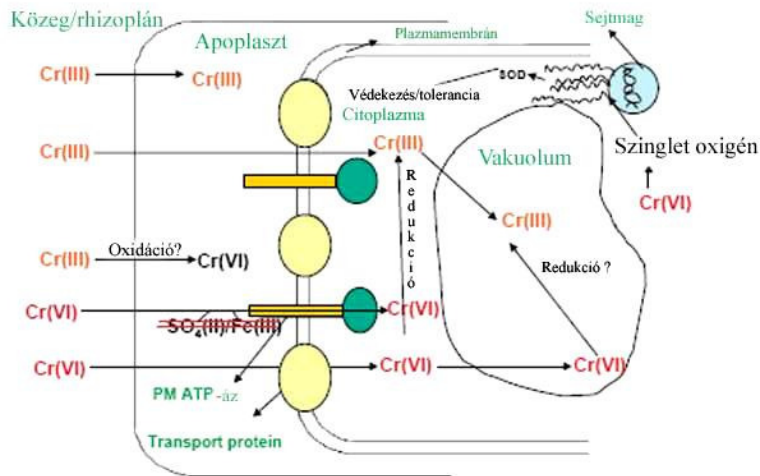
A kitermelt króm 60-70%-át ötvözéshez használják (pl. rozsdamentes acél). A termelési folyamatok során nagy mennyiségben használják például a bőrparban, festékek és bevonatok gyártásában, kohászatban (Cervantes et al. 2001). A világon kitermelt krómérc mennyisége az 1971-től 1980-ig terjedő időszakban közel a duplája volt az előző évtizedének (46500 illetve 86200 t) (Moore és Ramamoorthy 1984, Dirilgen 1998). Mivel a krómfelhasználás folyamatos növekedése a jövőben is valószínű, nagy szükség van a lehetséges kedvezőtlen hatások feltárására.

A vizekben a Cr(III) és Cr(VI) forma dominál. Oxigénnel jól ellátott vizekben termodinamikailag a Cr(VI) stabil, azonban a kinetikailag stabil Cr(III) is jelen lehet különböző kötésekkben. A hexavalens króm gyakran oxigénnel kapcsolódva van jelen a környezetben, kromát- (CrO_4^{2-}) vagy dikromát- ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) oxianionokként (Hörcsik et al. 2007). Ezzel szemben a trivalens króm oxidok, hidroxidok, szulfátok formájában van jelen és főleg szerves molekulákhoz kötődik, így kevésbé mobilis. A Cr(VI) erős oxidáló ágens, szerves anyagokkal reagálva Cr(III)-á alakul. Ennek a folyamatnak a sebessége a közeg savasságával párhuzamosan emelkedik. Nagymennyiségű Cr(VI) azonban esetlegesen meghaladhatja a közeg redukáló képességét és így a Cr(VI) szennyezőként is megjelenhet a környezetben. Ezzel szemben a

Cr(III), jó oxigénellátottság (O_2 -fölösleg) esetén kromáttá alakulhat (Cervantes et al. 2001).

Szennyezetlen felszíni vizekben az oldott króm átlagosan $1-2 \mu\text{g l}^{-1}$ koncentrációban van jelen, míg a tengervizekben $0,05-0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ koncentráció-tartományban (Moore és Ramamoorthy 1984). A földi kőzetekben a króm $100-300 \text{ mg kg}^{-1}$ koncentrációban van jelen. Talajokban a krómkoncentráció $5-3000 \text{ mg kg}^{-1}$ között változik. Vízzennyezés esetén az oldott króm koncentrációja akár több nagyságrenddel is meghaladhatja a természetes háttértékeket. Papírmalom elfolyó vizében pl. mértek már 80 mg l^{-1} Cr(VI) koncentrációt is (Cervantes et al. 2001).

Veszélyessége ellenére a króm felvétele és élettani hatása a többi nehézfémhez képest még mindig kevésbé ismert. Ennek egyik fő oka az, hogy az oxidációs forma könnyen megváltozik (1. ábra), és az egyes formák eltérő módon viselkednek az élő szervezetben (Kaszycki et al. 2005).



1. ábra A króm felvétele és feltételezett viselkedése a növényi sejtben (Shanker et al. 2005 nyomán módosítva)

A stabil formák közül a Cr(III)-ra az állati és emberi szervezetnek kis mennyiségben szüksége van (Appenroth et al. 2000), de ez a forma nagy koncentrációban bizonyos metallo-enzimeket gátolhat (Shanker és Pathmanabhan 2004).

2.1.1. A króm felvétele a növényekben

A Cr(VI) forma minden mennyiségben mérgező. Mivel nem esszenciális tápelem, felvételére a növényekben nem alakult ki külön mechanizmus (1. ábra). A felvétel részben olyan esszenciális anionok karrierjeinek segítségével történik, mint például a szulfát (Kleiman és Cogliatti 1997, Cervantes et al. 2001, Kaszycki et al. 2005). A Fe és P valószínűleg szintén verseng a Cr(VI)-tal a kötőhelyekért (Shanker et al. 2005). Az aktív felvétel mellett a Cr(VI) passzív transzport-utakon is könnyen átjut a biológiai membránokon (Chandra és Kulshreshtha 2004).

A Cr(VI)-tal szemben a Cr(III) legvalószínűbben csak passzív transzport-utakon kerül a sejtbe. A sejtmembránon való keresztüljutása csak akkor lehetséges, ha lipofil ligandumokkal képez komplexet (Chandra és Kulshreshtha 2004, Shanker és Pathmanabhan 2004).

A mikroorganizmusok esetében a szulfát- és kromát-ionok felvételi folyamataiban a versengést már korábban leírták. Élesztőgombáknál a Cr(VI) felvétele egy nem-specifikus anion transzport-rendszeren, az ún. permeáz-rendszeren keresztül zajlik, amely fiziológiás körülmények között pl. a foszfát- és szulfátionok felvételéért felel (Cervantes et al. 2001). A szulfát- és kromát ionok antagonizmusát a növények esetében is többen leírták már (Appenroth et al. 2000, Cervantes et al. 2001, Kaszycki et al. 2005).

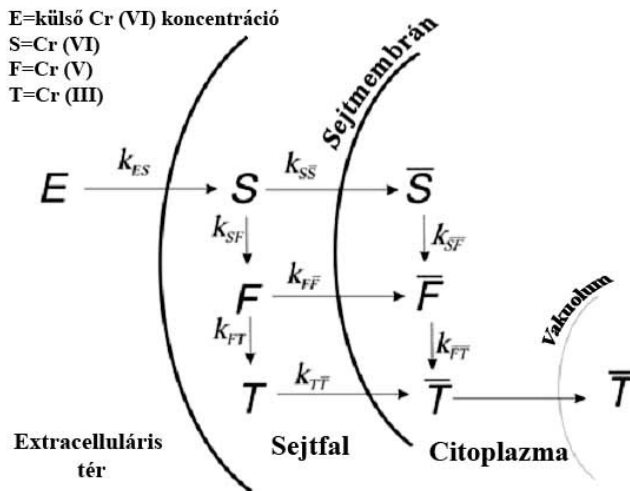
A szulfát aktív felvétele energiaigényes transzporttal, speciális szállítók segítségével történik. A felvételt gátolják a légzésgátlók, szétkapcsolók és bizonyos szubsztrát-analógok, mint pl. a molibdenát, szelenát, kromát (Datko és Mudd 1984, Severi 2001, Kaszycki et al. 2005).

A szulfátmegvonásnak kitett növények esetében az intenzívebb szulfátfelvétel mellett az olyan kémiai analógok, mint pl. a SeO_4^{2-} , CrO_4^{2-} nagyobb mértékű felvételét is tapasztalták (Kleiman és Cogliatti 1997, Kaszycki et al. 2005). Zayed et al. (1998) vizsgálataik során kimutatták, hogy az általuk vizsgált kultúrnövények közül a kénkedvelő Brassicaceae-család tagjai halmozták fel a legtöbb krómot.

2.1.2. A króm(VI) viselkedése a növényi sejtben

A szárazföldi növényekben a felvett króm nagy része (>97%) a gyökérben halmozódik fel (Zayed et al. 1998, Han et al. 2004), aminek az oka valószínűleg az, hogy a kromát Cr(III)-á redukálódva (2. ábra) a gyökér sejtjeinek vakuolumaiba kerül, és ott tárolódik (Appenroth et al. 2000, Shanker et al. 2005). A króm viselkedése a sejten belül és a vakuolumban még nem teljesen tisztázott (Appenroth et al. 2000, Kaszycki et al. 2005), mivel oxidációs állapota könnyen megváltozhat, és a folyamatok összetettsége miatt nehéz az egyes részfolyamatokat elkülöníteni. A Cr(VI) \rightarrow Cr(III) redukció a gyökér sejtjeiben valószínűleg a Fe(III)-reduktáz enzimek segítségével zajlik. Zayed et

al. (1998) eredményei szerint a redukcióhoz nem szükségesek a mikorrhiza gombák. Más szerzők (Panda és Choudhury 2005) viszont arról számolnak be, hogy a mikorrhiza a szárazföldi növényekben csökkenti a kromát gátló hatásait.



2. ábra A Cr(VI) feltételezett redukciós folyamatai (Appenroth et al. 2000, Kaszycki et al. 2005 nyomán)

Békalencse-fajoknál, csakúgy, mint más növényfajok esetében, a felvétel során a Cr(VI) először fizikai jellegű folyamatok során elfoglalja az apoplaszt (beleértve a sejtfal) szabad helyeit. Ezt követően, de már kisebb sebességgel a Cr(VI) átjut a sejtmembránon. Appenroth et al. (2000) eredményei alapján az első szakasz mintegy tízszer gyorsabban zajlik, mint a második. A felvétel sebessége nem-lineárisan függ a külső és sejten belüli krómkoncentrációktól. A Cr(VI) a sejtbe változatlan oxidációs állapotban, vagy redukciót követően jut be (2. ábra). A redukció során a $\text{Cr(VI)} \rightarrow \text{Cr(V)}$ átalakulás igen gyorsan, 10-15 perccel a Cr(VI) tartalmú közegbe helyezés után megindul, ami alapján valószínűsíthető, hogy a redukció elsősorban a sejtfal szabad helyein vagy a sejtmembrán külső felszínén zajlik. Az egyébként igen instabil Cr(V)-forma a sejtben több órán keresztül megmarad, ami azt jelzi, hogy valamilyen komplex formájában átmenetileg stabilizálódik (Micera és Dessi 1988). A további, $\text{Cr(V)} \rightarrow \text{Cr(III)}$ -redukció pontos mechanizmusa nem ismert (Appenroth et al. 2000, 2. ábra). A krómformák összetett átalakulási folyamatainak feltárását tovább bonyolítja, hogy a Cr(III)-forma H_2O_2 hatására Cr(VI)-tá alakulhat. Bizonyos eredmények szerint a Cr(III) biológiai redukálószer (L-cisztein, NADPH) hatására redukálódhat Cr(II)-vé. A Cr(II) H_2O_2 -dal reagálva hidroxilgyököt

képez, ami további károsító hatásokat eredményezhet (Shanker és Pathmanabhan 2004).

2.1.3. A króm(VI) hatásai az élő sejtben

Általánosságban a Cr(VI) a növények működésének minden területét befolyásolja. A hatásokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az egyed szintjén gátolja a csírázást, a gyökér, a hajtás és a levelek fejlődését (Panda és Choudhury 2005, Shanker et al. 2005, 1. táblázat). Valószínűleg a Cr(VI), mint oxidáló ágens károsítja az élő szervezet makromolekuláit, és ezek a hatások terjednek tovább más folyamatokra. Erős oxidálószerként elősegíti a reaktív gyökök (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$) képződését közvetlen elektrontranszferrel, illetve közvetve a metabolikus reakciók gátlásával (3. ábra). Ennek hatására fokozódik a lipidperoxidáció a sejtben (Panda és Choudhury 2005, Sinha et al. 2005).

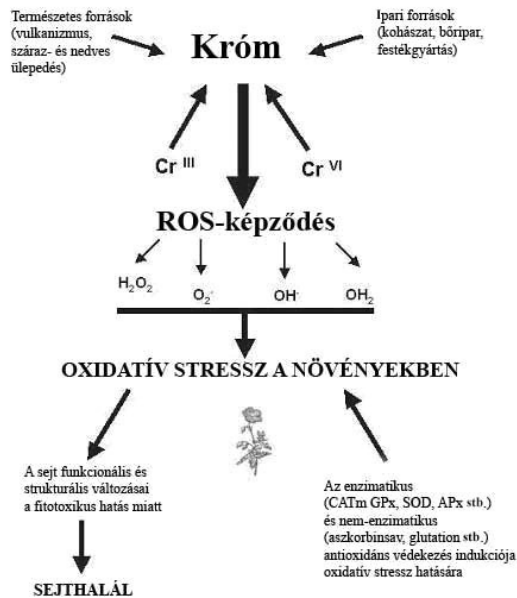
1. táblázat A króm(VI) általános hatásai a növények működésére

Folyamat	Hatások
Fotoszintézis	Az elektron transzport gátlása, a Calvin-ciklus enzimeinek gátlása, CO_2 -fixáció csökkenése, a kloroplasztisz belső membránrendszerének károsodása
Vízháztartás	Vízpotenciál csökkenés, hervadás, a vízszállító elemek átmérőjének csökkenése miatt elégtelen víz- és tápanyagszállítás
Ásványi táplálkozás	A N, P, K, Fe, Mg, Mn, Mo, Zn, Cu, Ca, B, S felvételének megváltozása
Enzimek és más vegyületek	Az asszimilációs enzimek gátlása, reaktív oxigéngyökök elleni védekező enzimek aktivitásának emelkedése, glutation-pool megváltozása

A fiziológiai folyamatok vizsgálata alapján a Cr(VI) befolyásolja a CO_2 -fixációt, az elektron-transzportot, a fotofoszforilációt és a különböző enzimek aktivitását. Azonban most sem ismert, hogy ehhez a gátló hatáshoz milyen arányban járul hozzá a kloroplasztisz ultrastruktúrájának károsodása, az elektrontranszport gátlása, vagy a Cr(VI)-nak a Calvin-ciklus enzimeire való hatása. Egyéb hatások sem zárhatók ki, többek között feltételezhető, hogy a fotoszintézis elektrontranszport-láncából eltéríti az elektronokat (Panda és Choudhury 2005, Shanker et al. 2005). A Cr(VI) a fotoszintetikus pigment-tartalomban is csökkenést okoz (Bassi et al. 1990, Oláh et al. 2008b).

A klorofill-szintézis gátlása a nehézfémstressz jellemző következménye, aminek egyik lehetséges oka a szintézis kulcsenzimének, a δ -aminolevulinsav-dehidratáznak a károsítása (Panda és Choudhury 2005, Sinha et al. 2005). Ugyanakkor a karotinoid-tartalom, illetve a karotinoidok fotoszintetikus pigmenteken belüli részaránya Cr(VI) jelenlétében megemelkedik (Nichols et al. 2000, Appenroth et al. 2001, Panda és Choudhury 2005, Sinha et al. 2005,

Oláh et al. 2008b), ami a védekező mechanizmusok indukcióját, illetve a karotinoidok nagyobb stabilitását jelezheti (Appenroth et al. 2001, Panda és Choudhury 2005, Oláh et al. 2008b).



3. ábra A króm-okozta oxidatív stressz (Panda és Choudhury 2005 nyomán, módosítva)

A szárazföldi hajtásos növények esetében Cr(VI) jelenlétében a vízforgalom különféle zavarait írták le (1. táblázat). Cr(VI) hatására csökken a levelek vízpotenciálja és a transzspirációs ráta. A sejtek turgorának csökkenését és azok plazmolízisét szintén megfigyelték. Cr(VI) hatására kisebb átmérőjű vízszállító elemek képződnek, és emiatt gyengébb a szár vízszállítása is (Shanker et al. 2005).

A Cr(VI) az ásványi táplálkozásra többféleképpen lehet hatással (1. táblázat). Így például a gyökér gátolt fejlődésén keresztül, vagy más esszenciális tápelemekkel történő versengés révén, vagy az aktív transzport gátlásával.

A Cr(VI) a különböző enzimek működését is erősen befolyásolja. Általánosságban jellemző, hogy az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó antioxidáns enzimek (SOD, APX, CAT stb.) aktivitása megemelkedik (1. táblázat), (Panda és Choudhury 2005, Shanker et al. 2004a).

A Cr(VI) mérgező hatása a szabadon úszó vízi növények esetében a szárazföldi növényekét sokszorosán felülmúlhatja. Ennek legfőbb oka az, hogy míg a szárazföldi növényekben a felvett króm legnagyobb része a gyökérben

halmozódik fel, addig a szabadon úszó vízi növények tápanyagfelvételében a gyökér nem vagy csak kevésbé játszik szerepet, így a króm a hajtásrészben jóval nagyobb koncentrációban jelenhet meg (Environment Canada 1999). Ezzel magyarázható, hogy ezeknek a vízinövényeknek a Cr(VI)-tal szembeni érzékenysége az algák és a szárazföldi növények közé esik (Appenroth et al. 2000).

A kromát iont erős toxicitása miatt, illetve mert a vízminőség viszonylag kevésbé befolyásolja a gátló hatását, az ökotoxikológiai tesztekben „referencia-méregként” (pozitív kontrollként) is alkalmazzák (Wang 1984, Dirilgen 1998, Environment Canada 1999).

2.1.4. Védekező mechanizmusok és a krómtolerancia

Specifikus, Cr(VI)-tal szembeni rezisztencia mechanizmusok még nem ismertek. Szennyezett talajokon és felszíni vizekben megfigyeltek Cr(VI)-toleráns mohafajokat (pl. *Comocephalum conicum*, Marchantiales), de nem tapasztaltak náluk specifikus védekező mechanizmusokat (Cervantes et al. 2001).

A már sejtbe bejutott nehézfémek által okozott oxidatív stressz kivédésében a legfontosabb szerepük az enzimatis és nem enzimatis antioxidánsoknak illetve a karotinoidoknak van (Shanker és Pathmanabhan 2004, Sinha et al. 2005).

Rocchetta et al. (2005) két, különböző nehézfém-szennyezett területről származó *Euglena gracilis* törzs vizsgálata alapján eltérő Cr(VI)-rezisztenciát tapasztaltak. A reaktív gyökök egyik fő támadáspontja a biológiai membránok többszörösen telítetlen zsírsavai. Különösen a fotoszintézishez köthető struktúrákban volt megfigyelhető a lipidperoxidáció. A rezisztens törzsnél alacsony Cr(VI)-koncentráció hatására megnőtt az össz-lipidtartalom, ami az egyik lehetséges védekező mechanizmus lehet. A rezisztens törzsnél megfigyelt magasabb telített zsírsav-arányt szintén a reaktívabb (oxidatívabb) környezetbe való adaptáció eredményének tulajdonították.

A növények nehézfém-toleranciájának egyik kulcstényezője a fitokelatinok termelése. A fitokelatinok glutationból szintetizált speciális fémkötő peptidok, melyek kelátkötés révén semlegesítik a nehézfém ionokat (Prasad 1997). Algák esetében kimutatták, hogy a Cr(VI) jelenléte indukálja a fitokelatin szintáz enzim aktivitását (Hörsik et al. 2004). A magasabbrendű növények esetében még viszonylag kevésbé tisztázott a kelátképző vegyületek szerepe a krómtoleranciában. Shanker et al. (2004b) Cr(VI)-érzékeny és -toleráns cirokfajták összehasonlítása során különbséget tapasztaltak a metallothionein szintézisért felelős MT3 gén aktivitásában, míg pl. Goupil et al. (2009) nem mértek növekedést a Cr(VI)-stresszelt paradicsomnövények MT2 génjének aktivitásában. A gyökerek által talajba juttatott szerves savaknak (pl.

almasav, citromsav, aminosavak) a kromátstressz kivédésében játszott szerepe szintén kevésbé feltárt a többi nehézfémhez viszonyítva (Shanker és Pathmanabhan 2004, Panda és Choudhury 2005).

Az antociánok, mint védővegyületek lehetséges szerepe

Az antociánok a növények legelterjedtebb színanyagai. Kémiaiilag az összefoglaló néven flavonoidoknak nevezett fenolvegyületek csoportjába sorolhatók. Az egyes antocián-vegyületek egymástól a hidroxil-csoportok számában, a molekulához kapcsolódó cukorkomponensek fajtájában, számában és helyzetében, illetve a cukrokhoz kapcsolódó alifás és aromás vegyületek típusában és számában különböznek (Kong et al. 2003).

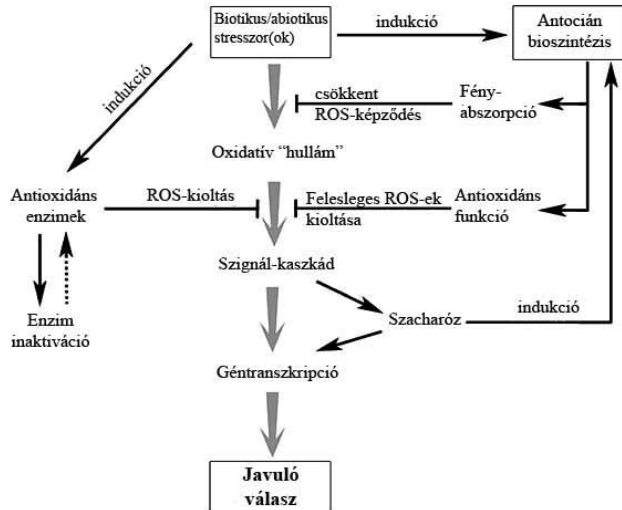
A növényekben az antociánok a legnagyobb mennyiségben a termésekben, a virágok szirmaiban találhatóak, de a levelek, a szárak, és a gyökerek is tartalmazhatják. A különféle szövetekben elsősorban a külső sejtrétegek, azaz az elsődleges bőrszövet, illetve a perifériális mezofill sejtek az antociánok fő tárolói. A növényi sejten belül a felhalmozódás helye a vakuolum (Chalker-Scott 1999, Close és Beadle 2003, Gould 2004, Manetas 2006).

Az antociánoknak a növényekben betöltött szerepéről a mai napig nincs egyértelmű magyarázat. A következőkben az antociánoknak a különböző kutatási eredmények alapján feltételezett funkcióit foglalom össze, Chalker-Scott (1999), Close és Beadle (2003), Gould (2004) és Manetas (2006) összefoglaló munkái alapján:

1. **Fényvédő funkció:** az antociánok többféle módon is védelmet jelenthetnek a növények leveleiben. Megjegyzendő azonban, hogy a növényfajok egy részénél, mint az általunk a vizsgálatokban alkalmazott *S. polyrrhizánál* is, az antociánok felhalmozódásának jellemző helye az alsó epidermisz, ami ezt a szerepkört nem támasztja alá.
 - a. **„elektron-elnyelőkként” működhetnek:** kioltják a fotoszintézisben nem hasznosuló felesleges elektronokat.
 - b. **fényelnyelő szerepük van:** főleg az árnyéklevelek esetében, a hirtelen erős fény hatását védik ki.
 - c. **UV-sugárzás kiszűrésében vehetnek részt:** az antociánok egyik elnyelési maximuma az ultraibolya tartományban van.
2. **Antioxidáns funkció:** például a fiatal és öregedő levelekben, az antociánok a fotoszintetikus apparátus kiegészítő védelmét láthatják el. Ez a vegyületcsoport ugyan *in vitro* erős antioxidáns tulajdonságokat mutat, *in vivo* még kevés közvetlen bizonyíték van ilyen szerepükre. Egyes vizsgálatok eredményei alapján a tiszta antocián extraktumok a reaktív oxigéngyökök majdnem minden fajtáját semlegesítik, az aszkorbinsavhoz és az α -tokoferolhoz képest akár négyszer nagyobb hatékonysággal.

3. **Ozmoregulációs funkció:** Az antociánok növénybeli felhalmozódása sokszor olyan jellegű stressz-hatások során jellemző, melyek közvetve vagy közvetlenül vízhiány-stresszhez is vezetnek. Mivel a felhalmozódó antociánok koncentrációja túl alacsony ahhoz, hogy az ozmotikus viszonyokat a növény számára éppen a kritikus vízhiányos periódusokban jelentősen befolyásolni tudják, nem várható, hogy az ozmoregulációban jelentős szerepet töltenének be.
4. **„Riasztó”-szerep:** Az egyik hipotézis alapján az antociánok pozitív hatása a színükben rejlik: az élénk színű, antocián tartalmú levelek riasztólag hatnak a növényeket fogyasztó rovarok számára. Az antociánok elnyelési maximuma (a zöld szintartomány) átfedi a levelek által leginkább visszavert fény hullámhosszát, emiatt valószínűsíthető, hogy a leveleket fogyasztó rovarok nehezebben veszik észre a növényt (mintegy beleolvad a háttérbe). Feltételezhető az is, hogy az antociános, élénkpiros színű leveleken a többnyire zöld színű, leveleket fogyasztó rovarok optikai álcázása nem hatékony, ezért az ilyen növényeket ezek inkább elkerülik (Manetas 2006). További feltételezés szerint az antociánok piros színe arra hívja fel a leveleket fogyasztó rovarok figyelmét, hogy a leveleknek magas a flavonoid-tartalma. Egyes flavonoidok pedig ártalmas hatásúak ezekre a fitofág szervezetekre. Ilyen módon, az összflavonoid-tartalomból kis hányadot kitevő antociánok a színükkel „költséghatékony” megoldást jelentenek a fiatal levelek védelmére (Manetas 2006).
5. **Komplex szerep:** Hatier és Gould (2008) „szignál-moduláció hipotézise” alapján az antociánok összetett szerepet játszanak a növényekben (4. ábra). „Árnyékoló” hatásukkal gátolják a szabadgyökök (ROS) képződését olyan esetekben (pl. alacsony hőmérsékleten), amikor az antioxidáns rendszer nem képes azokat hatékonyan semlegesíteni. Túlságosan intenzív szabadgyökképződés esetén antioxidánsokként védik az enzimatikus antioxidáns rendszer elemeit a szerkezeti károsodástól. Henzler és Steudle (2000) kimutatták, hogy a stressz alatt képződő H_2O_2 a sejtcompartmentek között diffúzióval könnyen mozog, és a vakuolumba is bekerülhet. A vakuolumban felhalmozódó antioxidánsok, mint az antociánok, részt vesznek a H_2O_2 detoxifikációjában és akadályozzák annak a sejtben történő migrációját. Az antociánok a ROS-jelátviteli utat ezáltal lefelé szabályozhatják, de emellett más jelátviteli utakkal is kapcsolódhatnak. Az antociánok jelátvitelben játszott szerepét támasztják alá azok a megfigyelések, melyek alapján az antocián-szintézis kulcsenzimeit kódoló génszakaszok expresszióját erősen felfelé szabályozza a szacharóz, amely más oldható cukrokkal együtt, a stresszhatásokkal szembeni tolerancia kialakításában jelentős szerepet játszik. Az eddigi

eredmények azt mutatják, hogy a szacharóz részt vesz mind a ROS-képző, mind a ROS-lebontó anyagcsere-folyamatoknak a szabályozásában, és ilyen módon a sejt ROS-egyensúlyának a beállításában (4. ábra).



4. ábra Az antociánok szerepe a növények reaktív oxigéngyökökkel szembeni védelmében Hatier és Gould (2008) „szignál-moduláció hipotézise” alapján (pozitív hatás = nyíl, negatív hatás = T-vonal).

2.2. Fitotoxikológiai tesztek

A fitotoxikológiai tesztek elterjedten alkalmazzák a különböző mérgező anyagok, vegyületek, peszticidok, nehézfémek hatásainak vizsgálatára. Az alkalmazásuk kezdetétől a tesztek sokféle típusa alakult ki, melyek különböznek egymástól a használt fajok, nevelési körülmények stb. tekintetében (Environment Canada 1999, Mkandawire és Dudel 2005b).

A toxicitás megállapítására a legelterjedtebben az általános mérgezési tünetek (klorózis, nekrozis, hervadás, torzulások, virág és termés módosulása stb.) megjelenését illetve a növények fejlődésének különböző jellemzőit (száraztömeg, frisstömeg, gyökér/hajtás aránya, növekedési és szaporodási ráták, hozam stb.) vizsgálják (Environment Canada 1999). Ezek a paraméterek olcsón és egyszerűen mérhetők, jól jellemzik a bekövetkező változásokat. Hátrányuk azonban, hogy általában nem specifikusak, sok esetben a nevelő közegben lezajló kémiai változások, a növények védekező mechanizmusai stb. befolyásolják az érzékenységüket. További hátrányuk, hogy a mérgezés nyomán bekövetkező változások gyakran hosszabb idő múlva jelentkeznek, ami

például az azonnali beavatkozást igénylő szennyezéseknél nem engedhető meg. Újabban folyamatosan jelennek meg a toxicitást gyorsabban, érzékenyebben, esetleg specifikusan jellemző módszerek (Mészáros et al. 1998, Gensemer et al. 1999, Juneau és Popovic 1999, Oláh et al. 2003, Drinovec et al. 2004).

2.2.1. Biomarkerek felhasználása

A tudományos ismeretek gyarapodásával és a technológia fejlődésével lehetővé vált, hogy a növények ökotoxikológiai vizsgálatára újabb, a korábbiaknál alkalmasabb vizsgálati módszerek kerüljenek kidolgozásra (Mészáros et al. 1998, Juneau és Popovic 1999). A hagyományos növekedési, szaporodási és túlélési tesztekkel összehasonlítva az egyed alatti szinten bekövetkező fiziológiai és biokémiai változások specifikusabban és érzékenyebben jellemzik a mérgezés hatásait. Ezek összefoglaló néven a biomarkerek (Cormier és Daniel 1994). Biomarker alatt az élőlényeknek a környezeti stressztényezőkre adott fiziológiai vagy biokémiai válaszát értjük, melynek segítségével próbálják a hatásokat kompenzálni, illetve tolerálni. Selye (1956) munkái alapján az élő szervezetet érő különböző külső, kedvezőtlen tényezőkre, mint pl. a szélsőséges hőmérséklet, a kiszáradás vagy elárasztás, a fertőzés, a túl alacsony vagy magas fényintenzitás, adott ún. nem-fajlagos választ stressznek nevezünk. Így stressznek tekinthetünk bármely olyan erős vagy gyenge, abiotikus vagy biotikus hatást, amely a szervezet normális működését befolyásolja. Grime (1979) munkája alapján stressznek tekintünk bármely olyan környezeti korlátozást, amely az egész növény vagy akár csak egyes szervek szárazanyag termelését a "genetikailag lehetséges" szint alá szorítja.

A biomarker-vizsgálatok elterjedését segítette a közreműködő mechanizmusok egyre mélyebb feltárása. A vizsgálatok egyre olcsóbbak, reprodukálhatóbbak, egyszerűbbek és automatizáltabbak lettek. Ilyen például az oxidatív stressz hatására a stressz-proteinek és lipidperoxidok képződésének (Panda et al. 2003), bizonyos metabolitok megjelenésének (Tkalec et al. 1998, Hörcsik et al. 2004, Hörcsik et al. 2005), az oxidázok (SOD, POD, CAT, APX stb.) aktivitásának (Teisseire és Vernet 2000, Vivek et al. 2000), és a fotoszintetikus pigmentek mennyiségének és mennyiségi arányainak (Bassi et al. 1990, Appenroth et al. 2001, Lakatos et al. 2003, Oláh et al. 2008a) mérése. A legtöbb biomarker vizsgálata igen hatóanyag-specifikus, de sok általános indikátor is létezik. Elterjedt például a fiziológiai aktivitás változásának (pl. fotoszintetikus hatékonyság - Nichols et al. 2000, klorofill-fluoreszcencia - Bolhár-Nordenkamp és Öquist 1993) követése olyan módszerekkel, melyek nem destruktívak, így a tesztnövények később további vizsgálatokhoz is felhasználhatóak (Gensemer et al. 1999, Oláh et al. 2003).

A fitotoxikológiai tesztekben egyre gyakrabban tanulmányozzák a toxikus anyagok hatására a fotoszintetikus pigment-tartalomban, illetve a pigmentek

arányában bekövetkező változásokat, mivel ezek a paraméterek érzékenyen jelzik a növény állapotában lezajló változásokat (González 2001).

A klorofill fluoreszcencia jelensége és felhasználása a növényi stresszállapot mérésére

A fotoszintetikus apparátus pigmentjei az abszorbeált fényenergia hatására gerjesztett állapotba kerülnek. A fotorendszerek antennapigmentjeinek gerjesztési energiája átadódhat a reakciócentrumok klorofill-*a* molekulája felé, de az alapállapot elérésének más útjai is lehetnek. Ezek közül a legfontosabb a hő és a fluoreszcencia formájában történő energialeadás. Az energia elvezetését szolgáló mechanizmusok egymással versengő folyamatok, egymással fordított arányban változnak (Schreiber et al. 1994).

Ha egy előzetesen sötétadaptált fotoszintetizáló növényi objektumot megvilágítunk, azt tapasztaljuk, hogy a klorofill-*a* fluoreszcenciájának intenzitása időben változik, és jól definiálható lokális minimumok és maximumok sorozatán keresztül éri el az egyensúlyi értéket. Ezt a folyamatot nevezik klorofill-fluoreszcencia indukciónak vagy első leírója után Kautsky-effektusnak (Lichtenthaler 1996). A klorofill fluoreszcencia túlnyomó részben a második fotokémiai rendszerből (PSII) származik.

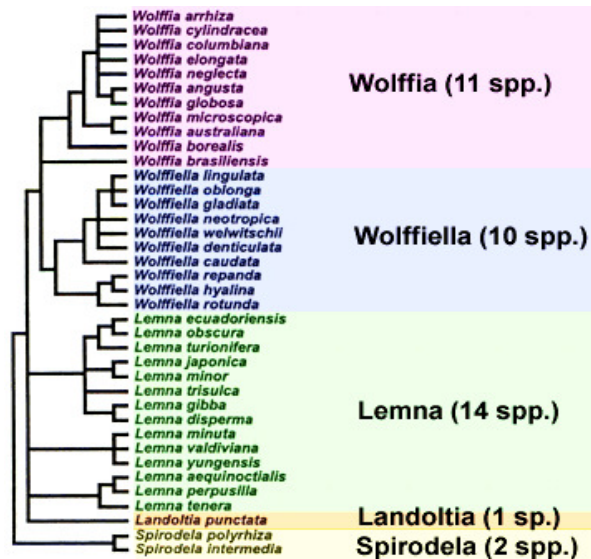
Stresszhelyzetben, illetve a növényi minta fiziológiai állapotától függően a klorofill-fluoreszcencia indukció paramétereiben változások következhetnek be.

A klorofill fluoreszcencia indukció módszer a technikai fejlődésnek (pl. a PAM-fluorométerek megjelenése) köszönhetően elterjedten alkalmazott vizsgálati eljárás lett a növényfiziológiai, ökofiziológiai, ökotoxikológiai kutatásokban. Előnye, hogy a mérés *in vivo*, a növények károsítása nélkül történik, a vizsgálatok gyorsan, rövid idő alatt nagyszámú mintán, illetve nagy területen elvégezhetőek. Az egyes klorofill fluoreszcencia paraméterek vizsgálata alapján lehetőség nyílik akár a fotoszintetikus apparátus különböző komponenseiben, az egyes folyamatokban bekövetkező változások jellemzésére is (Bolhár-Nordenkamp és Öquist 1993, Weiss és Roger 2001).

2.2.2. A békalencse-fajok alkalmazása ökotoxikológiai tesztekben

A békalencse-fajok (Lemnoidae, Araceae) kisméretű, redukált testfelépítésű, egyszikű, virágos növények. A békalencse-fajok közé Les et al. (2002) eredményei alapján, 5 nemzetség 38 fajt sorolják (5. ábra).

Nagy részük a vízfelszínen úszó hínártársulások tagja. Megfelelő körülmények közt gyorsan szaporodnak és a vízfelszíneken egybefüggő, vastag növényzónyvet hoznak létre (Crawford és Landolt 1993, Dickinson és Miller 1998, Driever et al. 2005).



5. ábra A békalencse-félék evolúciója és főbb rendszertani egységei, Les et al. 2002 nyomán

Megfelelő hőmérséklet, fény és tápanyagok biztosításával tenészeik mesterségesen is nevelhetők. Számos előnyös tulajdonságuk van, amelyek alapján előszeretettel használt ökotoxikológiai teszt-objektumok (Environment Canada 1999). Ezek a következők:

- a) megfelelő méret (nem szükséges nagy felszerelés a tartásukhoz, de elég nagyok a vizuális megfigyelésekhez)
- b) egyszerű testfelépítés
- c) gyors növekedés
- d) a vegetatív szaporodás dominanciája miatt genetikailag homogén tenészetek nyerhetők
- e) a tenészeik axenikusan könnyen nevelhetők folyékony vagy szilárd táptalajon, autotróf illetve heterotróf módon
- f) a laboratóriumi nevelés során más zárva-termő fajokhoz képest a környezeti feltételek (fény, hőmérséklet, tápelemek stb.) könnyebben szabályozhatók
- g) viszonylag nagy a térfogatukhoz viszonyított felületük, illetve nincs vagy nagyon vékony a kutikulájuk a tesztközeggel érintkező abaxiális levélfelületükön, azaz a vizsgálandó anyagok gyorsan és nagy dózisban jelenhetnek meg közvetlenül a fotoszintetizáló szövetekben is, elkerülve a gyökérben történő metabolizációt, kompartmentációt
- h) több fém-es elemnek is kitűnő akkumulátorai, ami a vízminőség-monitorozásra, illetve laboratóriumban a felvételi mechanizmusok tanulmányozására is alkalmassá teszi őket

- i) különösen érzékenyek a felületaktív anyagokra, hidrofób vegyületekre és hasonló kemikáliákra, melyek a víz-levegő határfelületen halmozódnak fel
- j) az algatesztekkel ellentétben a tápoldat a tesztek folyamán is cserélhető, illetve zavaros, színes vegyületet tartalmazó minták is vizsgálhatók

A békalencse-féléket az 1930-as évektől alkalmazzák a fitotoxikológiában. Már a legelső, fenoxi-herbicidek növényekre gyakorolt hatásait elemző vizsgálatok során is használták őket. 1979-ben az USA környezetvédelmi ügynöksége (USEPA) indítványozta a *L. minor* környezetbiztonsági vizsgálatokra alkalmas, reprezentatív vízi makrofiton fajként való besorolását az Egyesült Államokban (Environment Canada 1999).

Ezt követően egyre több környezetvédelmi, környezetegészségügyi szervezet alkalmazta a vízi makrofitonokat, köztük a békalencse-fajokat környezeti monitorozás és -vizsgálatok céljából, illetve a veszélyes anyagok engedélyeztetése során.

Mivel a békalencse-féléket eleinte más növényfajokkal párhuzamosan, összehasonlító fitotoxikológiai vizsgálatokban, illetve mindenhol az adott célnak megfelelő, vagy a lehetőségek által megszabott feltételekkel alkalmazták, igen sokféle teszt-típus jelent meg az idők folyamán. Mkandawire és Dudel (2005b) néhány jelentős folyóirat 1917 és 2002 közti toxicitási tesztekkel foglalkozó közleményeit tekintették át, és megállapították, hogy rendkívül nagy változatosság van az alkalmazott módszerek közt. Emiatt az eredmények is nehezen, vagy sok esetben egyáltalán nem vethetők össze. A különböző békalencse-fajoknak adott vegyületekkel szembeni érzékenysége az összehasonlítására viszonylag kevés eredmény született (Sobrero et al. 2004, Vervliet-Scheebaum et al. 2006, Appenroth et al. 2008, Oláh et al. 2008d, Oláh et al. 2009c)

A tesztek és az eredmények változatosságát jól példázza, hogy napjainkban a vízi makrofiton szervezetek vizsgálatában száznál is több tápoldat-típust használnak (Mkandawire és Dudel 2005b). A leggyakrabban alkalmazott teszt-fajok a *Lemna aequinoctialis*, *L. gibba*, *L. minor*, *L. paucicostata*, *L. perpusilla*, *L. trisulca*, *L. valdiviana*, *Spirodela polyrrhiza* (OECD 1998). A tesztek ezen kívül különbözhetnek a tenyészetek megvilágításában (folyamatos/fotoperiódus, erősség, spektrális összetétel), időtartamukban, kiépítésükben (t.i. statikus, szemi-statikus, átfolyásos).

A tesztek során leggyakrabban különféle növekedési paramétereket követnek nyomon: kolóniaszám, rametek száma, frisstömeg, száraztömeg, összfelület, gyökérhossz. Vizsgálhatják továbbá a klorofill-*a* és -*b*, feofitin-*a*, össz-nitrogéntartalom alakulását. Figyelhetik ezek mellett a kolóniák feldarabolódását (pl. ramet/kolónia arány), gyökérkárosodást, elszíneződést illetve klorózist, nekrozist, az úszóképesség csökkenését, a púpossgot, a rametek méretét stb (Environment Canada 1999).

Mivel a békalencse fajokat ma már rutinszerűen használják ökotoxikológiai kutatásokhoz, szükség volt a tesztek szabványosítására, ami lehetővé teszi az eredmények összevetését. Ezek a standard tesztek (pl. ASTM 1991, APHA 1992, SIS 1995, AFNOR 1996, EPA 1996, Environment Canada 1999, OECD 1998, ISO 1999) részletes előírásokat tartalmaznak a vizsgálatok minden körülményére, illetve az alkalmazott fajra, annak tenyészet-vonalára vonatkozóan. Az ökofiziológiai vizsgálatoknál azonban ez a sokszínűség máig megmaradt (Mkandawire és Dudel 2005b).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A tesztnövények

A vizsgálatokhoz három, világszerte, illetve a hazai vizeinkben is gyakori békalencse-fajt, a *Lemna gibba* L., *Lemna minor* L. és *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden steril tenyészteteit használtuk. A fajok jellemzői Felföldy (1996) munkája alapján a következők:

***Lemna gibba* L. (púpos békalencse):** egyedeinek szártagjai (a Dolgozatban „ramet”, Oborni és Bartha 1998) 1-1 gyökérrel rendelkeznek, a víz felszínén úsznak egyenként, vagy néhány (2-5) összenőve (1. kép). A felső, lapos oldaluk 2,5-8 mm átmérőjű, fonákjuk a laza, szivacsos állományú üreghálózat miatt domborúan kihasasodik, hálózatos rajzolatú. Rendszerint tiszta állományai alakulnak ki, de más békalencse-fajokkal társulva is megtalálható.



1. kép A tesztekhez használt axenikus tenyésztetből kivett *L. gibba* növények felülnézetből

***Lemna minor* L. (apró békalencse):** egyedeinek szártagjai (a Dolgozatban „ramet”, Oborni és Bartha 1998) 1-1 gyökérrel rendelkeznek, a víz színén úsznak magányosan, vagy néhány (2-4) összenőve. Átmérőjük 2-4 mm, alakjuk tojásdad, majdnem kerek (2. kép). Laposak, alul sem domborúak. Áttelelő példányai kisebbek.

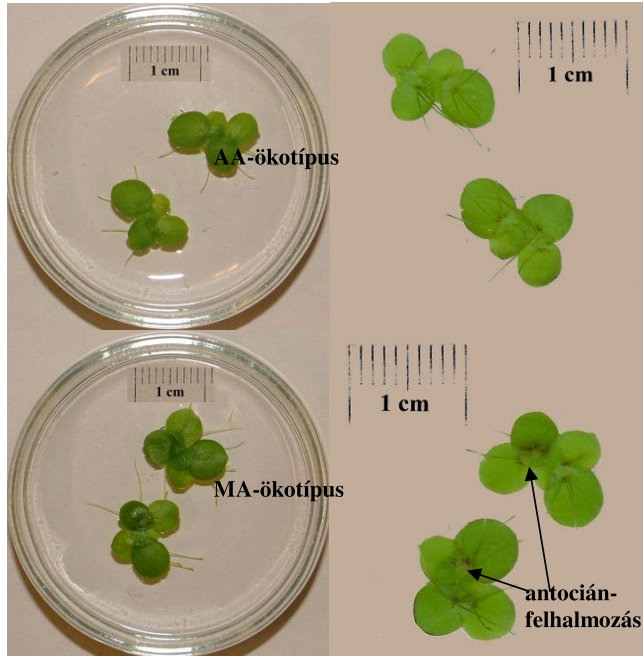


2. kép A tesztekhez használt axenikus tenyésztetből kivett *L. minor* növények felülnézetből

***Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden¹ (bojtos békalencse):** a szártagok (a Dolgozatban „ramet”, Oborni és Bartha 1998) magányosan vagy összenőve (2-10) úsznak a víz színén. Átmérőjük 10 mm körüli, alakjuk kerek vagy széles

¹ A szakirodalomban a bojtos békalencse latin nevét kétféle írásmóddal, közel egyforma arányban, „*S. polyrrhiza*” illetve „*S. polyrrhiza*”-ként is hivatkozzák. Felföldy (1990) nyomán az Értekezésben a *S. polyrrhiza* elnevezést használom.

visszás-tojásdad, színük-fonákuk lapos (3. kép). A szártagok fonákja jellemzően piros-lilás lehet az abaxiális epidermisz közelében felhalmozott antociánok miatt (3. kép). Gyökérzetük több, 10-13 (2-18) gyökérből álló gyökércsomó. A kedvezőtlen időszakok átvészelését 1-3 mm átmérőjű barna, vese alakú, lapos, gyökértelen, vízfenékre süllyedő teletörügyek biztosítják.



3. kép A tesztekhez használt axenikus tenyésztetből kivett kevesebb (AA-ökotípus, fent) illetve több antociánt felhalmozó (MA-ökotípus, lent) *S. polyrrhiza* növények felül- és alulnézetből

3.1.1. A törzstenyészetek létrehozása és fenntartása

A *L. gibba* tenyészeteket a DE TTK Növénytani Tanszékén 1991 óta fenntartott axenikus törzstenyésztetből nyertük.

A *L. minor* törzstenyészetekhez a növényegyedeket 2004-ben a Kis-Balaton II. ütem területéről (N 46° 40,001' E 017° 13,058') gyűjtöttük, majd ezekből hoztunk létre steril tenyészeteket.

A *S. polyrrhiza*-ból két törzstenyészetet tartottunk fenn. Az egyik a Kis-Balaton II. ütem területéről (N 46° 40,001' E 017° 13,058') származott (AA-ökotípus). A másik a Pannónia Rt. Kunszentmártoni börgyárának egykori szennyvízülepítő tórendszeréből származott (MA-ökotípus) (Szikszaei et al. 2008). A terület a korábbi bőripari tevékenységből eredően erősen

krómszennyezettnek tekinthető. Az üledék krómtartalma 2004-ben 129-7230 mg kg⁻¹ közötti volt (átlagosan 3604 mg kg⁻¹), melyből a növények számára felvehető formából 40-136 mg kg⁻¹-ot tartalmazott (Keresztúri et al. 2006). A két *S. polyrrhiza* ökotípus között a legnagyobb eltérés a növények antocián-felhalmozó képességében tapasztalható. A több antociánt felhalmozó MA-ökotípusnál „optimális”, nevelési körülmények között is lilás elszíneződés tapasztalható az abaxiális levélfelszíneken, míg a kevesebb antociánt felhalmozó AA-ökotípus növényeinek abaxiális levélfelszíne zöld volt a nevelési feltételek mellett (3. kép).

A faj szerint azonosított növényeket első lépésben 0,5%-os nátrium-hipoklorit-oldatos lemosással tisztítottuk meg a mikroorganizmusoktól (Bowker et al. 1980, Teisseire et al. 1998, Drinovec et al. 2004). Ezek után steril desztillált vízzel öblítettük le a növényeket, végül steril ½ erősségű Hutner-tápanyagra helyeztük őket. A műveletet hétnapos rendszerességgel végezve axenikus tenyészeteket nyertünk. Ezek a növények képezték a későbbi törzstenyészetek alapját.

Az axenikus törzstenyészeteket steril, ½ erősségű Hutner-tápanyagon, a DE TTK Növénytani Tanszékén, Convicon E7/2 típusú fitotronban, illetve a Tanszék Növény és Szövettenyésztő laboratóriumában tartottuk fenn, 100 μmol m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson, 25/18°C hőmérsékleten, 16/8 h nappali/éjszakai periódus mellett. A vizsgált békalencse-fajokból egy párhuzamos tenyészetet folyamatos, 100 μmol m⁻² s⁻¹ fényintenzitáshoz akklimálva tartottunk fent, a rövid-távú nehézfém kezelésekhez. A Hutner-tápanyag részletes leírása és elkészítési módja megtalálható Hutner és Landolt növényfiziológiai munkáiban (Hutner 1953, Landolt 1957). A Hutner-tápanyagot elterjedten alkalmazzák a békalencse-félék tenyészetének fenntartásához illetve vizsgálatához (McClure és Alston 1966, Filbin és Hough 1985, Lakatos et al. 1993, Mészáros et al. 1998, Gensemer et al. 1999, Artetxe et al. 2002, Juneau et al. 2003, Mkandawire és Dudel 2005a, Lasfar et al. 2007). Mkandawire és Dudel (2005b) a DIN-, Hutner-, Johnson- és Steinberg-tápanyagok összehasonlító vizsgálatai során megállapította, hogy a *L. gibba* a legnagyobb növekedési rátát a Steinberg-tápanyagon mutatja, amelyben azonban az oldott anyagok, különösen a nitrogén és foszfor koncentrációja jelentősen meghaladta a természetes vizekben mért értékeket. A *L. gibba* tenyészetek a második leggyorsabb növekedést a Hutner-tápanyagon mutatták, melynek oldott anyag tartalma ugyan szintén magasabb a felszíni vizek legtöbbszörében mértnek, anion- és kation összetétele azonban a DIN- és Jacobs-tápanyagoknál jobban reprezentálta a természetes körülményeket.

3.2. Az ökotoxikológiai tesztek összeállítása és kivitelezése

A kromátnak a vizsgált békalencse-fajokra gyakorolt hatásait, illetve az egyes békalencse-fajok egymáshoz viszonyított érzékenységét rövid- illetve hosszú-távú ökotoxikológiai tesztek során vizsgáltuk.

A króm(VI) hatásait az adott fiziológiai paraméterben bekövetkező változás (gátlás illetve emelkedés) alapján jellemeztük, a változásokat a kontroll értékek százalékában kifejezve.

Az eredmények feldolgozása és számolása (növekedési ráta, gátlás, átlag, szórás) Microsoft Excel 2003 szoftverrel, az eredmények ábrázolása Systat Sigmaplot 10.0 szoftverrel, az átlagok és standard hibák értékének feltüntetésével történt. A statisztikailag értékelhető eltéréseket Student-féle t-próbával (Systat Sigmaplot 10.0) $^+p<0,1$, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ szinteken tekintettük szignifikánsnak.

Az ökotoxikológiai tesztek során az egyes kezelések 3-4x ismétlésben történtek. A tesztek azonos összeállításban többször megismételtük. Az „Eredmények és értékelésük” c. fejezetben bemutatott eredmények egy-egy nagyobb alfejezeten belül (4.1, 4.2 fejezet) ugyanazon, reprezentatívnek tekinthető tesztekhez tartoznak.

3.2.1. A rövid-távú tesztek körülményei és a mért paraméterek

A rövid-távú króm(VI)-kezelések 48 órás, statikus tesztekben történtek. A rövid-távú vizsgálatokban alkalmazott teszt-tenyészetek és az azokhoz szolgáló törzstenyészetek fenntartása folyamatos, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson történt, minden egyéb körülmény megfelel a törzstenyészetek nevelési körülményeinek (3.1.1 fejezet).

A tesztekhez felhasznált növények előnevelése, 100 cm^3 $\frac{1}{2}$ erősségű Hutner-tápanyagot tartalmazó 300 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikokban történt, 7-10 napon keresztül.

A króm(VI)-ot a növényekkel egyszerre, a tesztek indításakor adtuk az $\frac{1}{2}$ erősségű Hutner-tápanyaghoz. A tesztekben 0, 50, 100 illetve 200 μM króm(VI)-koncentrációkat alkalmaztunk, amelyek beméréséhez 100 mM koncentrációjú $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -törzsoldatot használtunk.

A klorofill fluoreszcencia paraméterek mérése

A tesztek 48. órájában, a növények fiziológiai állapotának jellemzéséhez mértük az *in vivo* klorofill fluoreszcencia paramétereket.

A vizsgálatok során használt mérőrendszerek a pulzus-amplitúdó modulált (PAM) fluorométerek elvén működnek, melyek alkalmasak a klorofill fluoreszcencia paraméterek nagy pontossággal, és szükség esetén nagy

időfelbontással történő mérésére (Lichtenthaler et al. 2005, Klughammer és Schreiber 2008).

A sötétadaptált, illetve a megvilágítás során „steady state” fotoszintézist elért minták vizsgálata PAM-2000 fluorométerrel (Walz GmbH, Németország, DA-2000 vezérlőszoftver) történt.

A fotoszintetikus apparátusnak a gyorsan változó erősségű megvilágításhoz való alkalmazkodóképességét Mini-PAM fluorométerrel (Mini-Pam fluorométer, Walz GmbH, Németország, WinControl v2.08 vezérlőszoftver) vizsgáltuk.

Mivel az alkalmazott műszerek mérőkamráit a szárazföldi növények vizsgálatára alakították ki, a mérőkamrát a PAM-2000 esetében 2 cm^3 -es Eppendorf-csővekkel helyettesítettük (Oláh et al. 2003, Oláh et al. 2004, Oláh et al. 2005). A küvetákba $1,65\text{ cm}^3$ tápoldatot mértünk és a sötétadaptáció, illetve a mérések idejére annak felszínére helyeztük a mérendő növényeket.

A Mini-PAM alkalmazása során a gyors fényválaszok vizsgálatakor a növények sötétadaptációja a kezelőlombikokban történt. A mérések időtartamára a növényeket nedves szűrőpapírra helyezve tettük a készülék szenzorokkal ellátott mérőkamrájába.

Az egyes mérések során a mintául szolgáló fotoszintetizáló levélfelület $40\text{-}50\text{ mm}^2$ (a vizsgált fajtól függően 3-15 db ramet) volt.

A klorofill fluoreszcencia paramétereknek a króm(VI) hatására bekövetkező változásait a 48 órás tesztek végén mért kontroll értékek százalékában adtuk meg.

A sötétadaptált minták klorofill fluoreszcencia paraméterei

A sötétadaptált teszt növények klorofill fluoreszcencia paramétereinek mérését a növények 20 perces sötétadaptációja előzte meg, melynek célja a PSII reakciócentrumainak relaxált, „nyitott” állapotának elérése (Lichtenthaler et al. 2005). Előzetes méréseink alapján 20 perc hosszúságú sötétadaptáció mindhárom faj esetében elegendőnek bizonyult. A PSII „nyitott” állapotában, sötétadaptáció után mértük gyenge mérőfény alkalmazását követően az alapfluoreszcenciát (F_0 ; vörös mérőfény: $0,15\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Telítő fényimpulzust követően (fehér fényimpulzus: 0,8 sec, PFD $6000\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), a PSII „zárt” állapotában mértük a maximális fluoreszcenciát (F_m). A kettő különbségként számoltuk a változó fluoreszcenciát ($F_v = F_m - F_0$), és a maximális (potenciális) fotokémiai hatékonysággal arányos F_v/F_m , illetve F_m/F_0 arányt (Lichtenthaler et al. 2005).

A fényadaptált minták klorofill fluoreszcencia paraméterei

A „nem-telítő”, állandó intenzitású, ún. aktiváló fényvel történő megvilágítás során kialakuló „steady-state” állapotú fotoszintézis jellemzéséhez az ún. szaturációs pulzus módszert alkalmaztuk (6. ábra), (Lichtenthaler et al. 2005,

Klughammer és Schreiber 2008). Ennek során a növényeket folyamatos, a nevelési körülmények kétszeresének megfelelő intenzitású aktiváló fényvel (PFD = 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, vörös) világítottuk meg. 20 sec-ként telítő fényimpulzussal (PFD = 6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fehér) mértük a PSII aktuális fotokémiai hatékonyságának („Yield” vagy más néven Genty-paraméter, Genty et al. 1989, Lichtenthaler et al. 2005, Klughammer és Schreiber 2008), illetve a fotokémiai (qP) és nem-fotokémiai (qN) fluoreszcencia kioltó mechanizmusok (Schreiber et al. 1994) intenzitásának időbeli változását, és az alkalmazott fényerősségnek megfelelő egyensúlyi értékét. Számoltuk továbbá a teljes fotoszintézis hatékonyságával arányosnak tekintett relatív fluoreszcencia csökkenést („Relative Fluorescence Decrease” = RFD, Lichtenthaler et al. 2005). A károsodott PSII reakciócentrumok részarányának jellemzéséhez számoltuk a steady state állapotú mintákban a fotokémiai -Y(II)-, illetve a szabályozott -Y(NPQ)-, és a nem-szabályozott -Y(NO)- nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltó mechanizmusok részarányát (Klughammer és Schreiber 2008).

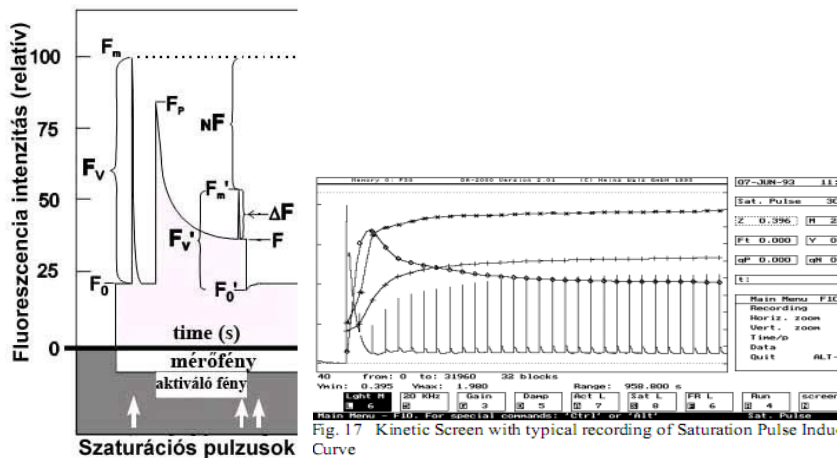


Fig. 17 Kinetic Screen with typical recording of Saturation Pulse Induction Curve

6. ábra A szaturációs pulzus sorozat során mért fontosabb klorofill fluoreszcencia paraméterek (balra, Lichtenthaler et al. 2005 nyomán), illetve azok időbeli lefutása (jobbra, Instruction Manual for PAM-2000, Walz GmbH, Németország)

A fényadaptált klorofill fluoreszcencia paraméterek számolása az alábbi képletek alapján történt (Schreiber et al. 1994, Lichtenthaler et al. 2005, Klughammer és Schreiber 2008):

$$\text{„Yield”} = \Delta F / F_m'$$

$$qP = (F_m' - F) / (F_m' - F_0')$$

$$qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_0)$$

$$RFD = (F_m - F) / F$$

$$Y(II) + Y(NPQ) + Y(NO) = 1$$

$$Y(II) = \Delta F / F_m'$$

$$Y(NPQ) = (F_m - F_m') / F_m'$$

$$Y(NO) = F / F_m$$

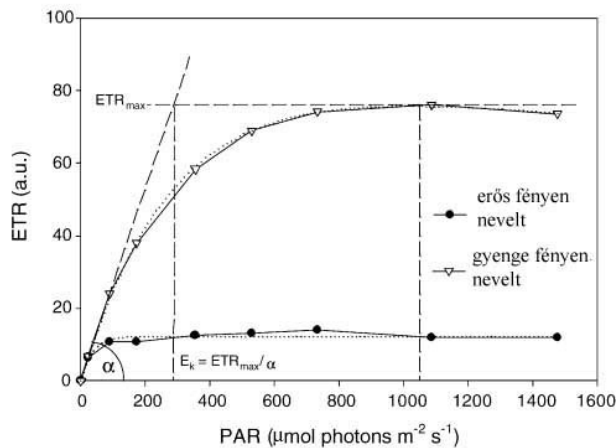
A gyors fényválasz-görbék mérése:

A minták előzetes, 20 perces sötétadaptációja után az aktiváló fény (fehér, halogénlámpa felhasználásával) intenzitását a szoftver (WinControl) egyperces lépcsőkkel (PFD = 50, 100, 150, 200, 300, 420, 650, 950 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) emeli. Minden megvilágítási lépcső után mértük az aktuális klorofill fluoreszcencia paramétereit, illetve az aktiváló fény tényleges erősségét (amely a halogénlámpa melegedése miatt kismértékben ingadozhat). A növényeknek az aktuális megvilágító fényintenzitás melletti fotokémiai hatékonyságát az előnevelés során uralkodó fényviszonyok, illetve a növények egészségi állapota határozza meg (Ralph és Gademan 2005). Mivel egyperces aktiváló megvilágítási lépcsőket alkalmaztunk, steady state fotoszintézis nem alakulhat ki az egyes megvilágítási lépcsők során. Ezért az eredmények ábrázolása az aktinikus fényintenzitással (PAR) szemben történik (7. ábra).

A Mini-PAM készülékkel mért illetve a szoftverrel számolt paramétereiből a króm(VI)-kezelések hatásának a jellemzésére az elektrontranszport ráta (ETR) indukálhatóságát használtuk fel.

Az elektron transzport a megvilágítás intenzitásának és a hozzá tartozó aktuális fotokémiai hatékonyságnak az ismeretében az alábbi képlettel számolható:

ETR ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) = **YIELD** * **PAR** * 0,5 * 0,84 (ahol a **YIELD** = $\Delta F/F_m'$, **PAR** = a megvilágító fény aktuális intenzitása ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); 0,5 = 1 e^- transzportja két abszorbeált fotont igényel a két fotokémiai rendszer miatt; 0,84 = az ETR-szorító empirikus értéke, átlagosan a beeső aktiváló fény 84%-a abszorbeálódik a levélben).



7. ábra Egy tipikus ETR-fényválasz görbe jellemző paramétereit (Ralph és Gademan 2005)

A fenti képlet alapján az elektrontranszport ráta tulajdonképpen az aktuális fotokémiai hatékonyságnak az adott aktiváló fényerősségnél mért értéke. Az aktiváló fényintenzitással szemben ábrázolva telítődési görbét mutat (7. ábra). A kapott gyors fényválasz-görbe jellemezhető az ETR emelkedésének kezdeti meredekségével, azaz a maximális fotonhasznosítási együtthatóval ($\alpha = \text{mol elektron mol foton}^{-1}$), az ETR maximális értékével ($\text{ETR}_{\text{max}} = \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), illetve a fénytelítési együtthatóval ($E_k = \text{ETR}_{\text{max}} \alpha^{-1} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$) (Ralph és Gademan 2005, Saroussi és Beer 2007), (7. ábra).

A fotoszintetikus pigmentek vizsgálata

A tesztek 48. órájában, a klorofill fluoreszcencia paraméterek mérését követően, meghatároztuk az egy-egy kezeléshez tartozó növényi anyag frisstömegét. A frisstömegek meghatározása 0,0001g pontossággal, analitikai mérlegen (AA-200DS, Denver Instrument Company) történt. A tömegmérések előtt a növényekre tapadt víz eltávolítása érdekében az egyes kezelésekhöz tartozó növényanyagot Eppendorf-csövekben, 3000 min⁻¹ fordulatszámon, 5 percig centrifugáltuk (Oláh et al. 2008a). A lemért mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztás után -80 °C-on tároltuk a további feldolgozásig.

A fotoszintetikus pigmentek mennyiségi vizsgálata a fagyasztott minták 20-50 mg-jának 80 %-os acetonos kivonatából történt. A klorofilok és karotinoidok spektrofotometriás meghatározásához Shimadzu UV/VIS 1601 spektrofotométerrel, az acetonos kivonatok abszorbanciáját 470, 646,8 és 663,2 nm-en mértük. Továbbá meghatároztuk a kivonatok abszorbanciáját 750 nm-en is a zavarosság megállapításához, amellyel az előző hullámhosszakon mért abszorbanciákat korrigáltuk. Az ily módon korrigált A_{470} , $A_{646,8}$ és $A_{663,2}$ értékek alapján az alábbi képletek (Wellburn 1994) segítségével számoltuk a pigmentek koncentrációját:

$$\text{Kl-a} = 12,25 * A_{663,2} - 2,79 * A_{646,8}$$

$$\text{Kl-b} = 21,5 * A_{646,8} - 5,1 * A_{663,2}$$

$$\text{Kar} = (1000 * A_{470} - 1,82 * \text{kl-a} - 85,02 * \text{kl-b}) / 198$$

A fotoszintetikus pigmentek koncentrációját egységnyi frisstömegre ($\text{mg g}_\text{f}^{-1}$) vonatkoztatva, a kontroll kl-a, kl-b, kla+b, kla/b, kar illetve kar/kla+b értékek százalékában adtuk meg.

3.2.2. A hosszú-távú tesztek körülményei

A vizsgált békalencse-fajok tenyészeinek növekedését 10 napos, hosszú-távú, statikus tesztekben követtük nyomon. A króm(VI)-kezelések a tesztek 0. napján, a növények tápoldatra helyezésével egyidőben indultak.

A tesztekhez felhasznált növények előnevelése, 100 cm³ ½ erősségű Hutner-tápoldatot tartalmazó 300 cm³-es Erlenmeyer-lombikokban történt 7-

10 napon keresztül. Az előnevelés illetve a tesztek körülményei megfelelnek a törzstenyészetek fenntartási körülményeinek.

A hosszú-távú króm(VI)-kezelésekhez 0, 25, 50 illetve 100 μM Cr(VI) koncentrációkat használtunk, amelyek bemérése 100 mM koncentrációjú $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -törzsoldatból történt.

Az egyes békalencse-fajok esetében a növekedési tesztek tenyészeteinek kiinduló adatait a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat A vizsgált békalencse-fajokkal végzett hosszú-távú, növekedési tesztek kiindulási biomassa adatai

	Kiinduló kolóniaszám (db)	Kiinduló rametszám (db)	Kiinduló frisstömeg (mg)	Kiinduló száraztömeg g (mg)	Kiinduló felület (mm^2)
<i>L. gibba</i>	3-4	9	4-5	0, 4-0, 45	--
<i>L. minor</i>	3-4	9	~2	~0,08-0,09	--
<i>S. polyrrhiza</i> AA- és MA- ökotípus	3-4	12	12-15	0,6-0,7	90-120

A tenyészetek növekedését az alábbi növekedési paraméterekkel jellemeztük:

Kolónia- és össz-rametszám: Egy kolóniának a vizsgálatok során a genetikai értelemben vett egyedét tekinttem, amely több, többé-kevésbé szorosan összetartozó „modulból”, rametből áll. Rametnek az Értekezésben a genetikai értelemben vett egyed (genet) olyan alegységét tekintem, amely rendelkezik az önálló élethez szükséges minden szervvel (Oborni és Bartha 1998). A tesztek során a kolónia- és össz-rametszám megállapítása naponta, a nap ugyanazon időszakában, szabad szemmel történő számolással történt.

Biomassza: A teszt-tenyészetek biomasszájának megállapítása analitikai mérlegen (AA-200DS, Denver Instrument Company), 0,0001 g pontossággal történt.

Frisstömeg: a tesztek 0. napján a tesztek kiindulási biomassa mennyiségének megfelelő növényi anyag, a tesztek 10. napján pedig a teljes teszt-tenyészetek frisstömege. A frisstömegek meghatározása előtt, a növényekre tapadt víz eltávolítása érdekében az egyes kezelésekhöz tartozó növényanyagot 3000 rpm fordulatszámon, 5 percig centrifugáltuk.

Száraztömeg: a tesztek 0. és 10. napján a meghatározott frisstömegű minták tömegállandóságig szárítás (24 h, 85 °C) után mért tömege.

Levélfelület: a tenyészetek levélfelületének méréséhez a növényeket 1 mm vastag vízréteget tartalmazó Petri-csészékbe helyeztük, és az alsó felületüket síkágyas szkennelrel (HP PSC 2175), 600 dpi felbontással digitalizáltuk. A digitális képek feldolgozása, és a levélfelületek számolása a felbontás ismeretében Adobe Photoshop 7.0 szoftverrel történt. A területek

meghatározásának hibája, milliméterpapírral történő kalibráció alapján $\pm 0,5\%$ -os volt.

A tenyészetek fejlődését a 0. és 10. napon mért adatok alapján, **az alábbi képlettel számolt relatív növekedési rátával jellemeztük** (Environment Canada 1999):

$$\text{RGR} = (\ln x_t - \ln x_0) / t$$

ahol:

x_0 =a kiindulási érték (ramet- és kolóniaszám, biomassza, felület),

x_t =a t időpontban mért érték,

t=idő (napok száma).

A tenyészetek fejlődésének gátlását az alábbi képlettel számoltuk (Environment Canada 1999):

$$\text{I\%} = [(RGR_{\text{kontroll}} - RGR_{\text{kezelt}}) / RGR_{\text{kontroll}}] * 100$$

ahol:

RGR_{kontroll} = a kontroll tenyészet adott paraméterre vonatkoztatott növekedési rátája,

RGR_{kezelt} = a kezelt tenyészet adott paraméterre vonatkoztatott növekedési rátája

3.2.3 A *S. polyrrhiza* ökotípusok vizsgálata során alkalmazott további módszerek

Az antocián-felhalmozás mérésének módszerei

A levélfelületek mérése során a tenyészetek digitális képét Adobe Photoshop 7.0-val dolgoztuk fel. Ezt a módszert vettük alapul a *S. polyrrhiza* esetében az antocián-felhalmozást *in vivo* meghatározó eljárás kidolgozásához (Oláh et al. 2008a, Oláh et al. 2009b). A *S. polyrrhiza* abaxiális levélfelszínén az antociánok felhalmozódása jellegzetes piros-lilás elszíneződést okoz. A digitális képfeldolgozás során elkülönítettük a zöld, és a lila, „antociános” felületeket és azok mérete külön-külön meghatározhatóvá vált (Oláh et al. 2008a, Oláh et al. 2009b). A lila felületeket mm^2 -ben, illetve a teljes levélfelület százalékában adtuk meg.

A tesztek 10. napján, a tenyészetek levélfelületének és frisstömegének meghatározását követően a növényeket $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on fagyasztottuk és tároltuk. Az antocián-tartalmat spektrofotometriásan (Shimadzu UV/VIS 1601) metanol:deszt.víz:HCl 79:20:1 v/v/v arányú keverékével készült kivonatban mértük. A kivonatok antocián-tartalmát az 530 nm-en mért abszorbanciájuk (A_{530}) alapján számoltuk. Mivel az 530 nm-en történő antociánmérést a klorofill-*b* fényelnyelése zavarja, Mancinelli (1984) javaslatára az A_{530} abszorbanciaértéket korrigáltuk a klorofill-*b* 657 nm-en mért

fényelnyelésével (A_{657}), illetve a kivonatok 750 nm-en mért abszorbanciájával az alábbi képlet alapján, és egységnyi biomasszára vonatkoztatva adtuk meg.

$$C_{\text{ant}} = \{(A_{530} - A_{750}) - [0,25 * (A_{657} - A_{750})]\} (\text{biomassza})^{-1}$$

Az antociánok koncentrációjával arányos abszorbanciáját frisstömegre, száraztömegre ($A_{530} \text{ g}^{-1}$ ft ill. szt), illetve egységnyi levélfelületre ($A_{530} \text{ mm}^{-2}$) vonatkoztatva adtuk meg.

Paraquat-kezelések az oxidatív stresszérzékenység méréséhez

A *S. polyrrhiza* AA- illetve MA-ökotípusánál az oxidatív stressz kiváltásához paraquatot (Pq; Paraquat-methyl-14C-dichloride-hydrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) alkalmaztunk (Kós et al. 2008, Oláh et al. 2009c, Prado et al. 2009). A kezelések során a tesztnövényeket (10-15 db ramet ismétlésenként) három órán át, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fényintenzitáson, 4 cm^3 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 és $100 \mu\text{M}$ koncentrációjú Pq-oldaton tartottuk, 4x ismétlésben.

Az oxidatív károsodást a háromórás Pq-kezelések végén, a fotokémiai hatékonyság csökkenésével (Fv/Fm, Fm/Fo ld. 3.2.1 fejezet) illetve a lipid-peroxidáció mértékével jellemeztük.

A lipid-peroxidációt közvetetten, a relatív elektrolitszivárgás („Relative Electrolyte Leakage” = REL%) alapján jellemeztük (Kanoun-Boulé et al. 2009). A tesztnövényeket a Pq-kezelést követően ionmentes vízzel mostuk le, majd 24 órás inkubáció után (4 cm^3 ionmentes vízben, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, sötétben) mértük az oldatok vezetőképességét (EC1) (Cole-Parmer Instrument Co. 19100-00), mely a membránpermeabilitással arányos. A teljes biomassza iontartalmával arányos vezetőképesség méréséhez a növényeket hőkezeltük (90 min , $95 \text{ }^\circ\text{C}$), és újabb 24 órás inkubáció után ismét mértük az oldatok vezetőképességét (EC2). **A membránkárosodás számolása a $\text{REL}\% = (\text{EC1}/\text{EC2}) * 100$ képlet alapján történt.**

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A króm(VI) hatása a békalencse-fajok növekedésére és fotoszintézis aktivitására

4.1.1. A növekedési paraméterek változása a hosszú-távú tesztekben

A három vizsgált békalencse-faj axenikus tenyészeinek ½ erősségű Hutner-táppoldaton mutatott növekedési sebességének összevetéséhez, illetve a kromáttal szembeni érzékenységük felméréséhez elővizsgálatokat végeztünk, ahol hosszú-távú, 10 napos tesztek alkalmaztunk. Ezen kívül áttekintettük a hasonló témájú közleményeket is. Az eredmények alapján hosszú-távú tesztekben a kromát hatásának vizsgálatához 100 µM kromátkoncentrációjú tápoldat megfelelőnek bizonyult. A kromát 100 µM koncentrációban már mindhárom fajnál mérhető gátlást eredményezett (Oláh et al. 2008a, Oláh et al. 2008b, Oláh et al. 2008c, Oláh et al. 2009a, Oláh et al. 2009b), az alkalmazott tesztkörülmenyek mellett azonban hosszabb távon sem okozta a tesztnövények pusztulását. A saját eredmények mellett az alkalmazott békalencse-fajokra fellelhető irodalmi adatok is a 0-200 µM közötti koncentráció-tartomány alkalmazását indokolták. Susplugas et al. (2000) eredményei alapján 10 nap alatt 40 µM Cr(VI) már lassulást okoz a rametszám növekedésében. Kaszycki et al. (2005) megfigyelései alapján a Cr(VI) 100 µM koncentráció fölött már erősen gátolta a *S. polyrrhiza* fejlődését. Ince et al. (1999) hétnapos tesztek során a *L. minor* növekedési rátái alapján 8,5 mg l⁻¹-es, azaz ~150 µM-os EC₅₀ értéket, míg Tripathi és Chandra (1991) *S. polyrrhizára* 18,1 mg l⁻¹ (~320 µM) 14 napos LC₅₀ értéket állapított meg. Appenroth et al. (2001) *S. polyrrhizával* végzett vizsgálati során a teszt-tenyészetek 0-200 µM Cr(VI)-kezelést kaptak 10 napon keresztül. Bassi et al. (1990) vizsgálati során a növekedési, morfológiai illetve pigmentösszetételbeli változásokat 0,1-10 mg l⁻¹ (2~200 µM) Cr(VI) koncentráció tartományban vizsgálta.

A laboratóriumban különböző vizsgálati célokra fenntartott három vizsgált békalencse-faj a kolóniák számának változása alapján ½ erősségű Hutner-táppoldaton eltérő sebességű növekedést mutatott (az eredmények nincsenek feltüntetve). Azonos körülmények közt nevelt, különböző békalencse-fajok eltérő sebességű gyarapodását Lemon et al. (2001) is leírták a *L. minor*, *S. polyrrhiza* és *Wolffia borealis* esetében. A tenyészetek növekedési sebességében tapasztalt különbségeket az új rameteknek a leváláskor mért érettségi állapotával magyarázták, azaz, minél kifejtettebben válik le az új ramet az anyanövényről, az apikális dominancia révén az egy rameten fejlődő összes utódok száma és a képződés sebessége annál

alacsonyabb lesz az anyanövény élettartama során (Lemon et al. 2001). A leválás pillanatában kifejtettebb, nagyobb méretű utódok kompetíciós képessége azonban nagyobb, mivel a felszíni vizek esetében a morfológiai tulajdonságoknak fontos szerepe van abban, hogy mely növények helyezkednek el a növényzónyeg tetején (Dickinson és Miller 1998). A növekedési ráták ilyen értelmezése alapján a leglassabb gyarapodást mutató *S. polyrrhiza* inkább a k-stratégiához közelebbi, a leggyorsabban fejlődő *L. minor* pedig az r-stratégiához közelebbi terjeszkedési potenciállal jellemezhető. A *L. gibba* az általunk mért növekedési rátája alapján a *L. minor* és *S. polyrrhiza* közötti átmenetet képvisel.

A leggyorsabb gyarapodást a *L. minor* tenyészetek mutatták, melyekben a megfigyelt kolóniák száma háromnaponta megduplázódott ($RGR=0,318\pm 0,007 \text{ nap}^{-1}$). A *L. gibba* illetve a *S. polyrrhiza* AA-ökotípusának tenyészetek ennél lassabban fejlődtek ($RGR=0,175\pm 0,009$ illetve $0,199\pm 0,005 \text{ nap}^{-1}$ a *L. gibbánál*, illetve a *S. polyrrhizánál*). A *S. polyrrhiza* MA-ökotípusának fejlődése az AA-ökotípusénál is lassabbnak bizonyult. A különböző békalencse-fajok króm(VI)-érzékenységét összehasonlító 4.1 fejezetben a *S. polyrrhiza*ra vonatkozó eredmények bemutatása során a továbbiakban minden esetben csak a Kis-Balatonból származó AA-ökotípus adatai szerepelnek. A *S. polyrrhiza* AA és MA-ökotípusa közti különbségek részletes bemutatása és értékelése, a vizsgált paraméterek illetve a tesztfeltételek részbeni eltérése miatt külön, a 4.2 fejezetben történik.

A króm(VI) 100 μM koncentrációban mindhárom fajnál a tenyészetek fejlődésének erős csökkenését okozta, a csökkenés azonban nem egyforma arányú volt a három vizsgált faj esetében (az eredmények nincsenek feltüntetve). A kolóniák számának változása alapján a króm(VI) növekedést gátló hatása a *L. minor*nál a kezelések 6. napján a *L. gibba* és a *S. polyrrhiza* esetében pedig a 7. napján jelentkezett a kontroll értékekhez viszonyítva (az eredmények nincsenek feltüntetve).

A legnagyobb visszaesést a *S. polyrrhiza* tenyészetek mutatták, melyekben a króm(VI)-kezelt tenyészetek növekedési rátája 53%-kal ($RGR=0,094\pm 0,008 \text{ nap}^{-1}$) maradt el a kontroll értékektől. A *L. minor* a 10. napon mért, kolóniák számára vonatkoztatott növekedési ráta alapján ennél szignifikánsan kisebb ($p<0,01$) érzékenységet jelzett, 43%-os visszaesséssel ($RGR=0,181\pm 0,008 \text{ nap}^{-1}$), míg a legkevésbé, 26%-kal a *L. gibba* tenyészetekben maradt el a kolóniákra vonatkoztatott növekedési ráta a kontrolltól ($RGR=130\pm 0,009$).

A békalencse-fajok jellemző tulajdonsága, hogy az új kolóniák képződésének a sebessége a környezeti feltételek változásaira érzékenyen reagál, de nem mindig tükrözi azokat egyértelműen. Ennek az oka, hogy az élőhelyi feltételek (megvilágítás, hőmérséklet, tápelem ellátottság, populáció zsúfoltsága) szélsőségessé válásával, illetve egyéb stressz-

tényezők felléptek az egy kolóniát alkotó rametek átlagos száma gyakran megváltozik (Datko és Mudd 1984 - *L. paucicostata*, Lasfar et al. 2007, Dirilgen 1998 - *L. minor*, Tkalec et al. 1998 - *L. minor* és *S. polyrrhiza*, Severi 2001 – *L. minor*, Oláh et al. 2008d – *L. gibba*, *L. minor*, *S. polyrrhiza*). A tenyészetek kolóniaszámának vizsgálata azonban mégis hasznosnak bizonyulhat a tesztnövényeket érő stressz jellemzéséhez. A békalencse-féléknél a kolóniánkénti átlagos rametszámot illetően: pl. Lasfar et al. (2007) a fotoperiódus, Datko és Mudd (1984) a szulfát ellátottság; Tkalec et al. (1998) a fűrőiszap, Dirilgen (1998), Severi (2001), Oláh et al. (2008d) pedig a nehézfémek ilyen befolyásoló hatására mutatnak rá. A környezeti körülmények megváltozásakor, illetve stressztényezők felléptek a ramet/kolónia arány jelentősen megváltozhat. A másodlagosan kialakuló oxidatív stressz hatására a kolóniák feldarabolódnak, akár különálló rametekre is széteshetnek (Li és Xiong 2003, Li és Xiong 2004). Stressz felléptek ennek azonban az ellenkezője is bekövetkezhet, azaz a rametek leválása lelassul, megáll, így a nem stresszelt növényekhez képest magasabb kolóniánkénti rametszám tapasztalható (Severi 2001, Li és Xiong 2003, Oláh et al. 2008d, Oláh et al. 2009a).

A vizsgálataink során a fenti irodalmi adatokhoz hasonlóan stressz hatására a kolóniánkénti rametszám megváltozását figyeltük meg (3. táblázat). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a tesztek első néhány napja során a három faj tenyészteteiben a rametek kolóniánkénti átlagos számának a változása nem jelzi megfelelően a króm(VI) (és egyéb toxikus anyagok) hatásait. Ez a jelenség leginkább a *S. polyrrhiza* tenyészteteinél figyelhető meg, ahol a kromát hatására fellépő oxidatív stressz a kolóniák szétadarabolódását okozta. Emiatt ennél a fajnál a tesztek 2. napjáig a króm(VI)-kezelt tenyészetekben magasabb kolóniaszám volt megfigyelhető, mint a kontroll értékek. Ugyanakkor az össz-rametszámban ez a különbség a kontroll és a króm(VI)-kezelt tenyészetek között nem tükröződik ebben az időszakban.

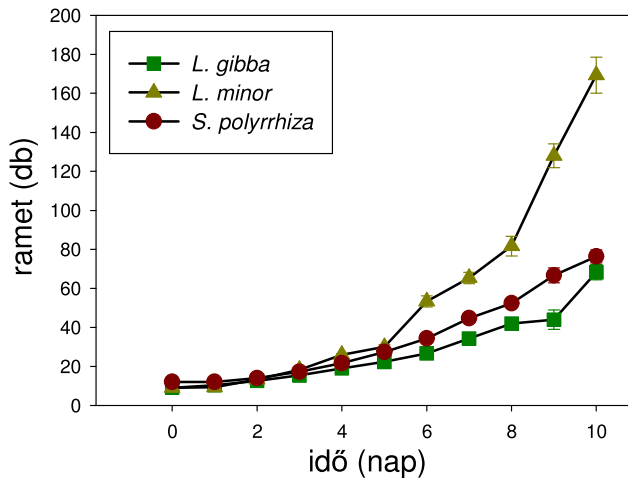
3. táblázat A három békalencse-faj teszt-tenyészteteinek össz-rametszámok alapján számolt növekedési rátája, illetve egy kolóniára jutó átlagos rametszáma a tesztek 10. napján (n=3)

	RGR _{rametszám} (ramet ramet ⁻¹ nap ⁻¹)		Ramet/kolónia (db db ⁻¹)	
	Kontroll	100 µM Cr(VI)	Kontroll	100 µM Cr(VI)
<i>L. gibba</i>	0,202±0,009	0,128±0,009	3,4±0,3	2,8±0,1
<i>L. minor</i>	0,293±0,009	0,148±0,018	2,5±0,1	2,1±0,1
<i>S. polyrrhiza</i>	0,185±0,007	0,139±0,014	3,6±0,1	5,4±0,5

A tesztidőszak második felében a folyamat ellentéte tapasztalható, a krómkezelt *S. polyrrhiza* tenyésztetknél a kolóniánkénti átlagos rametszám jóval meghaladja a kontroll értékeket (Severi 2001, Li és Xiong 2003, Oláh et

al. 2008d, Oláh et al. 2009a, 3. táblázat). A *L. gibba* és *L. minor* esetében a kromátkezelt kolóniák átlagos rametszáma végig a kontroll értéke alatt marad (3. táblázat).

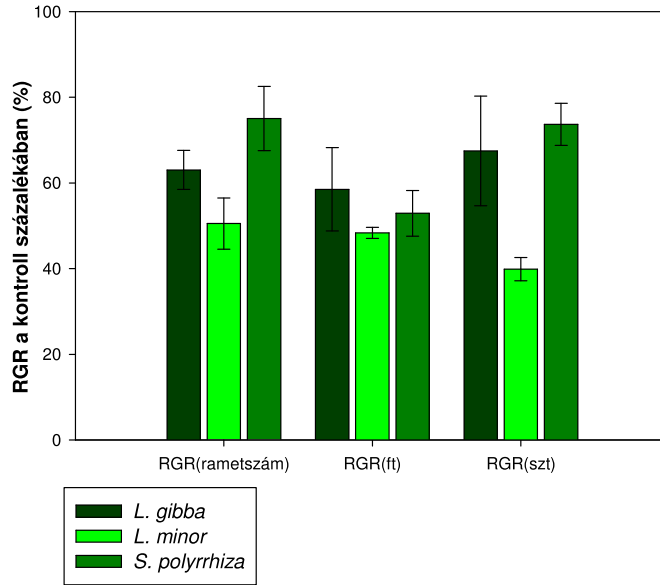
A három vizsgált faj eltérő sebességű fejlődésére mutatnak rá a tenyészetek össz-rametszámai is (3. táblázat, 8. ábra, Oláh et al. 2008d). A leggyorsabb rametszám növekedés a *L. minor* tenyészteteinél figyelhető meg. A tesztek 10 napja során a tiszta, kromátmentes tápoldaton nevelt tenyészetekben az össz-rametszám megduplázódása 48-76 óránként következett be (169 ramet a tesztek 10. napján, 8. ábra). A *L. gibba* illetve a *S. polyrrhiza* tenyésztetei a *L. minor*-nál lassabban, egymáshoz viszonyítva közel azonos sebességű rametszám gyarapodást mutattak (68 illetve 76 ramet a tesztek 10. napján, 3. táblázat, 8. ábra).



8. ábra Az össz-rametszámok változása a három vizsgált békalencse-faj kontroll tenyészteteiben a tesztek 10 napja során (n=3)

Az össz-rametszámok eredményei a kolóniaszámnál nagyobb pontossággal mutatták a króm(VI)-kezelés növekedést gátló hatásait.

A *L. minor* tenyészteteiben már a tesztek 4. napján a kontrolltól alacsonyabb értékek figyelhetők meg és a tesztek 10. napjára jelentősen, 49%-kal maradnak el a kontroll értékektől (3. táblázat, 9. ábra). A *L. gibba* illetve a *S. polyrrhiza* esetében a gátló hatás a króm(VI)-kezelések 5. napjától jelentkezik. A *L. gibba*-nál a növekedési ráta visszaesése 10 nap alatt 37%-ot, a *S. polyrrhiza* esetében 25%-ot ért el (3. táblázat, 9. ábra).



9. ábra A három vizsgált békalencse-faj króm(VI)-kezelt tenyészteteinek rametszám ($RGR_{(rametszám)}$), frisztömeg ($RGR_{(ft)}$), illetve száraztömeg ($RGR_{(szt)}$) alapján számolt növekedési rátája a tesztek 10. napján, a kontroll százalékában ($n=3$)

Az össz-rametszámok változása alapján a különböző békalencse-fajok króm(VI)-tal szembeni érzékenysége eltérő volt. A legnagyobb kromátérzékenység a *L. minor* esetében volt mérhető. A *S. polyrrhiza* (AA-ökotípus) és a *L. gibba* tenyészteteiben ettől szignifikánsan kisebb gátlás volt mérhető. A két utóbbi faj közül az 1% átlagok alapján a *S. polyrrhiza* kisebb visszaesést mutatott, mint a *L. gibba*, az átlagok közötti különbség azonban csak kis mértékben szignifikáns ($p < 0,1$). Sobrero et al. (2004) eredményei alapján alacsony Cr(VI)-koncentrációk mellett a *L. minor* (IC_{25} : 0,49, IC_{50} : 3,0 $mg\ l^{-1}$) nagyobb érzékenységet mutatott, mint a *L. gibba* (IC_{25} : 0,70, IC_{50} : 4,17 $mg\ l^{-1}$). 100 μM (5,6 $mg\ l^{-1}$) Cr(VI) koncentráció csak a *L. minor* esetében okozott közel 50%-os gátlást, a többi faj tenyészteteiben ennél kisebb RGR-csökkenést mértünk. Ez a Cr(VI) koncentráció magasabb volt az előző közleményekben megfigyelt IC_{50} értékeknél. Az alacsonyabb IC_{50} értékek oka, a tápoldat és a nevelési feltételek eltérései mellett a Sobrero et al. (2004) által alkalmazott hosszabb (14 napos) tesztperiódus (Eberius et al. 2000), illetve a tesztrendszerük szemi-statisztikus kiépítése, mely nagyobb érzékenységet biztosít (Mkandawire, és Dudel 2005b). Ugyancsak a tesztek eltérő hosszának, illetve a nevelési feltételek eltéréseinek tudható be, hogy Ince et al. (1999) *L. minor* esetében, hétnapos tesztek során az általunk tapasztaltnál jóval magasabb, ~150 μM -os EC_{50} kromátkoncentrációt

állapított meg. A *S. polyrrhiza* esetében 100 µM Cr(VI)-nál tapasztalt gátlások (ld. még 4.2 fejezet) az alkalmazott nevelési feltételek illetve a tesztrendszerek eltéréseit figyelembe véve, megfelelnek az irodalomban közölt (Tripathi és Chandra 1991, Susplugas et al. 2000, Kaszycki et al. 2005) eredmények alapján valószínűsíthető értékeknek.

A vizsgált három békalencse faj közül a tenyésztetek biomassza változása alapján az össz-rametszámokhoz hasonlóan a *L. minor* mutatta a leggyorsabb növekedést (4. táblázat). A másik két vizsgált faj közül a tesztek 10. napjára a *L. gibba* kontroll tenyészteteinek a frisstömeg gyarapodása ($p < 0,01$), a *S. polyrrhiza* tenyészteteinek pedig a száraztömeg gyarapodása volt gyorsabb ($p < 0,01$) (4. táblázat).

4. táblázat A három békalencse-faj teszt-tenyészteteinek friss- és száraztömeg alapján számolt növekedési rátája a tesztek 10. napján (n=3)

	RGR _{frisstömeg} (g g ⁻¹ nap ⁻¹)		RGR _{száraztömeg} (g g ⁻¹ nap ⁻¹)	
	Kontroll	100 µM Cr(VI)	Kontroll	100 µM Cr(VI)
<i>L. gibba</i>	0,334±0,010	0,195±0,032	0,303±0,008	0,204±0,039
<i>L. minor</i>	0,398±0,005	0,193±0,005	0,430±0,007	0,171±0,012
<i>S. polyrrhiza</i>	0,288±0,005	0,152±0,015	0,360±0,011	0,265±0,018

A kromátkezelések a tenyésztetek frisstömegének növekedését az össz-rametszámok esetében tapasztaltnál is nagyobb mértékben gátolták, de a vizsgált fajok biomasszájának kromátérzékenysége közötti különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak (9. ábra). A száraztömeg alapján számolt RGR a frisstömeg RGR-hez képest szignifikánsan kisebb mértékben gátlódott a *S. polyrrhiza* ($p < 0,01$) és nem szignifikánsan a *L. gibba* esetében, ami a szárazanyag tartalom emelkedését jelzi ezeknél a fajoknál. A *L. minor*-nál azonban ezzel ellenkező irányú változást figyeltük meg ($p < 0,01$).

A Cr(VI)-tal szemben legérzékenyebb faj, a *L. minor* tenyészteteiben a biomasszanövekedés visszaesése a tesztek 10. napjára a frisstömeg esetében 52%-os, a száraztömeg esetében 60%-os volt (4. táblázat, 9. ábra). A *L. gibba* és a *S. polyrrhiza* biomassza gyarapodási üteme közel azonos mértékben csökkent a króm(VI)-kezelések hatására, a két faj közötti különbségek egyik esetben sem bizonyultak szignifikánsnak. A *L. gibba* kromátkezelt tenyészteteiben a frisstömegre illetve száraztömegre vonatkoztatott növekedési ráták a tesztek 10. napján 41, illetve 33%-kal, míg a *S. polyrrhiza* esetében 47% illetve 24%-kal maradtak el a kontroll értékektől (4. táblázat, 9. ábra).

Az eredményeink alapján megállapítható, hogy a biomassza változások a rametszámoknál is érzékenyebben jelzik a tenyésztetek fejlődésének gátlását Cr(VI) jelenlétében, ami az új rametek képződésének lelassulása mellett a rametek átlagos méretének a csökkenését is jelenti. A standardizált

békalencse-tesztekben az egyes növekedési paraméterek eltérő érzékenysége (Eberius 2001a), illetve a különböző méreganyagokra adott eltérő válaszok miatt írják elő a három általános növekedési paraméter (össz-rametszám, biomassza, levélfelület) közül legalább kettő egyidejű nyomon követését (EPA 1996, OECD 1998, ISO/CD 15799 1999). Az össz-rametszám kisebb érzékenysége több tényezőre vezethető vissza. Az össz-rametszám, mint növekedési változó megállapítása kvantált egységek (darabszám) alapján történik, míg a levélfelület illetve a biomassza folyamatosan változó jellemző (Eberius 2001b). Másrésről a békalencse-féléknél a vegetatív szaporodás (i.e. sarjadzás) sajátosságai miatt az új rametek embriói bizonyos ideig az anyanövények specializálódott részeiben, az ún. „zsebekben” fejlődnek (Eberius 2001b). A növénykében a stressz hatására felerősödő sejtmegnyúlás miatt a fejlődő kezdemények rövid idő alatt láthatóvá, megszámlálható egységgé válnak, így az össz-rametszám a tesztek első napjaiban látszólag, akár a kontroll értékét is meghaladó, nagyobb növekedést mutathat (Eberius 2001b). A biomasszában, illetve a levélfelületben az össz-rametszámnál nagyobb mértékű visszaesését, azaz az egyes rametek átlagos méretének csökkenését, mely jelenség mind a három vizsgált békalencse-fajnál megfigyelhető volt, több mérgező anyag, köztük a kromát okozta stressz alatt is leírták már (Eberius 2001b, Naumann et al. 2007).

4.1.2. A klorofill fluoreszcencia paraméterek változása a rövid-távú tesztekben

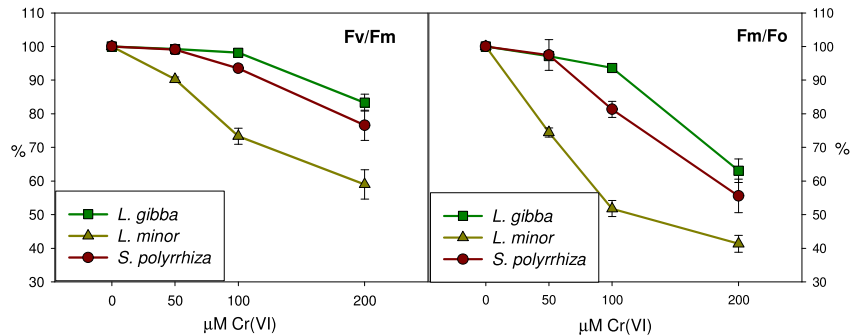
A három vizsgált békalencse-faj króm(VI)-tal szembeni érzékenységének az összehasonlítása 48 órás, 50, 100 illetve 200 μM -os Cr(VI)-koncentrációjú kezelésekkel történt. A klorofill fluoreszcencia paraméterek a fotoszintézis egyes alapfolyamatairól nyújtanak információt, ezért a Cr(VI)-tal szembeni érzékenységük sok esetben nagyobb, illetve a változások hamarabb jelentkeznek, mint a növekedés gátlása (Juneau et al. 2002, Oláh et al. 2003, Oláh et al. 2004, Hörcsik et al. 2006, Oláh et al. 2008a). A Cr(VI) 50-200 μM koncentráció tartományban a saját korábbi, hosszú-távú tesztekben végzett vizsgálataink eredményei alapján (Oláh et al. 2003, Oláh et al. 2004, Oláh et al. 2005, Oláh et al. 2008a, Oláh et al. 2008b) már befolyásolja a tesztnövények fotokémiai hatékonyságát, de tíznapos tesztidőszakban nem okozott olyan drasztikus gátlásokat, hogy a fajok közötti, feltételezett kromátérzékenységbeli eltérések jól kimutathatóak legyenek. Susplugas et al. (2000) eredményei alapján háromnapos, 40 μM -os kromátkezelés hatásai már kimutathatók a *S. polyrrhiza* növények Fv/Fm hányadosában. Appenroth et al. (2001) *S. polyrrhiza*-val végzett vizsgálatainak során a tíznapos tesztekben alkalmazott kromátkoncentrációk 0, 10, 50, 100, 150 illetve 200 μM voltak,

míg a Cr(VI)-nak a *L. gibba* fotoszintézisére gyakorolt hatásait Ali et al. (2006) 20, 100 illetve 200 μM koncentrációkkal vizsgálta.

A klorofill fluoreszcencia paraméterek változása alapján a Cr(VI) az alkalmazott koncentráció tartományban erősen befolyásolta a növények fotoszintetikus hatékonyságát már 48 óra alatt is. A gátló hatás már rövidebb idő, mintegy 24 óra alatt kialakul, és a további krómkezelés hatására már csak a gátlás mértékének kisebb növekedése következik be (Oláh et al. 2008a). A gátló hatás kialakulásának mintázata a Cr(VI)-felvétel időbeli alakulásával magyarázható. Kaszycki et al. (2005) eredményei alapján a *S. polyrrhiza* által felvett Cr(VI) mennyiségében az expozíciót követő 24 h után már nincs jelentős emelkedés. Az első 48 órában gyors, majd folyamatosan lassuló kromátfelvételt tapasztalt Garg és Chandra (1990) is a *Ceratophyllum demersum* L. esetében.

A sötétadaptációt követően mérhető, a PSII potenciális fotokémiai hatékonyságát tükröző Fv/Fm hányados a különböző növényfajok egészséges egyedeinél a szöveti felépítéstől és a levélfelszín tulajdonságaitól függően 0,75-0,85 között van (Lichtenthaler et al. 2005). Az alkalmazott mérőrendszerrel vizsgált békalencse-fajok kontroll növényeinél 0,77-0,8 közötti értékek voltak mérhetőek, hasonlóan a szakirodalmi adatokhoz (Gensemer et al. 1999, Frankart et al. 2003, Mészáros et al. 1998, Oláh et al. 2003, Oláh et al. 2004, Oláh et al. 2005, Oláh et al. 2008a).

Az Fv/Fm paraméter változásai alapján a vizsgált három békalencse-faj közül a Cr(VI)-tal szemben legérzékenyebbnek a *L. minor* bizonyult (10. ábra). 48 h elteltével már 50 μM Cr(VI) is 10%-os csökkenést ($p < 0,001$) okozott az Fv/Fm értékében. 100 illetve 200 μM Cr(VI) további, 27 illetve 41%-os visszaesést ($p < 0,001$) okozott a kontroll értékéhez ($0,779 \pm 0,005$) viszonyítva (10. ábra).



10. ábra A potenciális fotokémiai hatékonyság (Fv/Fm), illetve a maximális (Fm) és alap (Fo) fluoreszcencia arányának (Fm/Fo) kontroll értékekhez viszonyított százalékos változása a vizsgált békalencse-fajok tenyészteteiben, az alkalmazott kromátkoncentráció függvényében, a rövid-távú tesztek 48. órájában (n=4)

A *S. polyrrhiza* (AA-ökotípusa) esetében 50 μM Cr(VI)-kezelés nem okozott mérhető gátlást 48 h alatt. 100 μM Cr(VI) esetében a tesztek 48. órájában 6,5%-os, 200 μM Cr(VI)-nál pedig 23%-os csökkenés (mindkettőnél $p < 0,01$) volt megfigyelhető a kontroll értékéhez ($0,782 \pm 0,009$) viszonyítva (10. ábra).

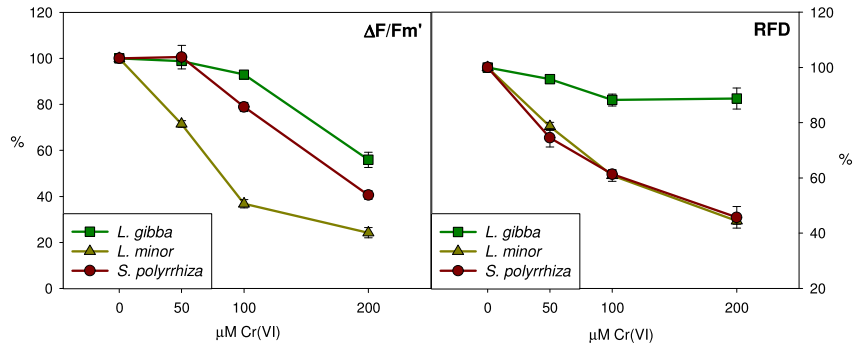
Az Fv/Fm változása alapján a legkisebb króm(VI)-érzékenység a *L. gibbanál* volt tapasztalható. 50 és 100 μM Cr(VI) 48 h alatt csak kismértékű, 1 ($p < 0,01$) illetve 2%-os ($p < 0,001$), míg 200 μM Cr(VI) is csupán 17%-os gátlást eredményezett a kontroll ($0,783 \pm 0,001$) viszonyítva (10. ábra).

Az Fv/Fm hányadosnál érzékenyebbnak mutatkozik a stressz felléptére az Fm/Fo paraméter (Lichtenthaler et al. 2005, Oláh et al. 2005). A két paraméter érzékenysége között egyedül az 50 μM Cr(VI)-tal kezelt *S. polyrrhiza* tenyészetekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az egyes fajok króm(VI)-kezelt tenyészeteiben a kontrollhoz viszonyított Fm/Fo csökkenésének a mértéke a *L. minornál* 26, 48 illetve 59%-os volt 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására. A *S. polyrrhizánál* ugyanez a paraméter 2,5 (NS), 19 illetve 44%-kal (mindkettőnél $p < 0,001$), a *L. gibbanál* pedig 3 ($p < 0,01$), 6 ($p < 0,001$) illetve 37%-kal csökkent 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására (10. ábra).

Az Fv/Fm illetve Fm/Fo értékek visszaesése a változó fluoreszcencia (Fv) csökkenését, azaz az alap- (Fo) és maximális fluoreszcencia (Fm) közötti különbség csökkenését jelzik (Lichtenthaler et al. 2005). A vizsgálataink alapján az Fv értékének visszaesése a *L. gibba* és *S. polyrrhiza* tenyészetekben elsősorban a reakciócentrumok állapotát jellemző Fm csökkenésének a következménye, míg a csak az LHC2 állapotát tükröző Fo értéke csupán kismértékben emelkedik (az eredmények nincsenek feltüntetve). Az Fm és Fo értékének egymástól eltérő változása alapján megállapítható tehát, hogy a 48 órás króm(VI) kezelések során bekövetkező károsodások elsősorban a PSII reakciócentrumát érintették. A króm(VI)-kezelésekkel szemben legérzékenyebbnak bizonyult *L. minor* tenyészeteiben az Fv változása nemcsak az Fm csökkenésének, hanem az Fo növekedésének is köszönhető, ami jelzi, hogy a Cr(VI) a PSII reakciócentrumokon kívül az LHCII állapotában is változást okoz.

Az aktiváló fényel megvilágított tesztnövényekben mért, a PSII aktuális fotokémiai hatékonyságát tükröző $\Delta F/Fm'$ alapján a sötétadaptációt követően mért klorofill fluoreszcencia paraméterekhez hasonlóan a legnagyobb króm(VI)-érzékenységet a *L. minor* mutatta (11. ábra). Már 50 μM Cr(VI) is 28%-os $\Delta F/Fm'$ csökkenést eredményezett a kontrollhoz ($0,523 \pm 0,012$) viszonyítva, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására pedig a visszaesés elérte a 63 illetve 76%-ot. A *S. polyrrhizánál* a 48 órás Cr(VI)-kezelés a sötétadaptált növények eredményeihez hasonlóan csak 100 illetve 200 μM koncentrációnál

okozott $\Delta F/F_m'$ gátlást (21 illetve 59%, 11. ábra). A *L. gibba*-nál figyeltük meg a legkisebb $\Delta F/F_m'$ visszaesést, ami a 48 órás Cr(VI)-kezelés végére 200 μM Cr(VI) hatására is csupán 44%-ot ért el (11. ábra). A *L. minor* tenyészeteiben a $\Delta F/F_m'$ értékét minden alkalmazott Cr(VI)-koncentráció szignifikánsan csökkentette ($p < 0,001$). Ezzel szemben a *L. gibba* és *S. polyrrhiza* esetében csak 100 és 200 μM Cr(VI) okozott szignifikáns ($p < 0,05$) változást.



11. ábra Az aktuális fotokémiai hatékonyság ($\Delta F/F_m'$), illetve a relatív fluoreszcencia csökkenés (RFD) kontroll értékekhez viszonyított százalékos változása a vizsgált békalencse-fajok tenyészeteiben, az alkalmazott kromátkoncentráció függvényében, a rövid-távú tesztek 48. órájában ($n=4$)

A teljes fotoszintézis hatékonyságát jellemző, „vitalitási indexnek” (Lichtenthaler et al. 1986) is nevezett relatív fluoreszcencia csökkenés (RFD) mindhárom vizsgált fajnál csökkent a kromátkezelések hatására (11. ábra). A többi vizsgált klorofill fluoreszcencia paraméterrel szemben azonban a *S. polyrrhiza* és a *L. minor* közel egyforma érzékenységet mutatott, statisztikailag értelmezhető különbséget egyik alkalmazott kromátkoncentráció hatására sem tapasztaltunk a két faj tenyészeteiben mért gátlások között. A csökkenés jóval nagyobb volt, mint a *L. gibba* esetében. 50 μM Cr(VI) hatására 48 óra elteltével 26 (*L. minor*) és 21%-os (*S. polyrrhiza*), míg 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására 39-39 illetve 54 és 55%-kal maradt el a kontrolltól ($2,218 \pm 0,088$ a *L. minor*-nál és $2,499 \pm 0,115$ a *S. polyrrhiza*-nál). A *L. gibba* esetében 50 μM Cr(VI) nem szignifikáns, 4%-os, 100 és 200 μM Cr(VI) 12 és 11%-os ($p < 0,05$) gátlást okozott (11. ábra).

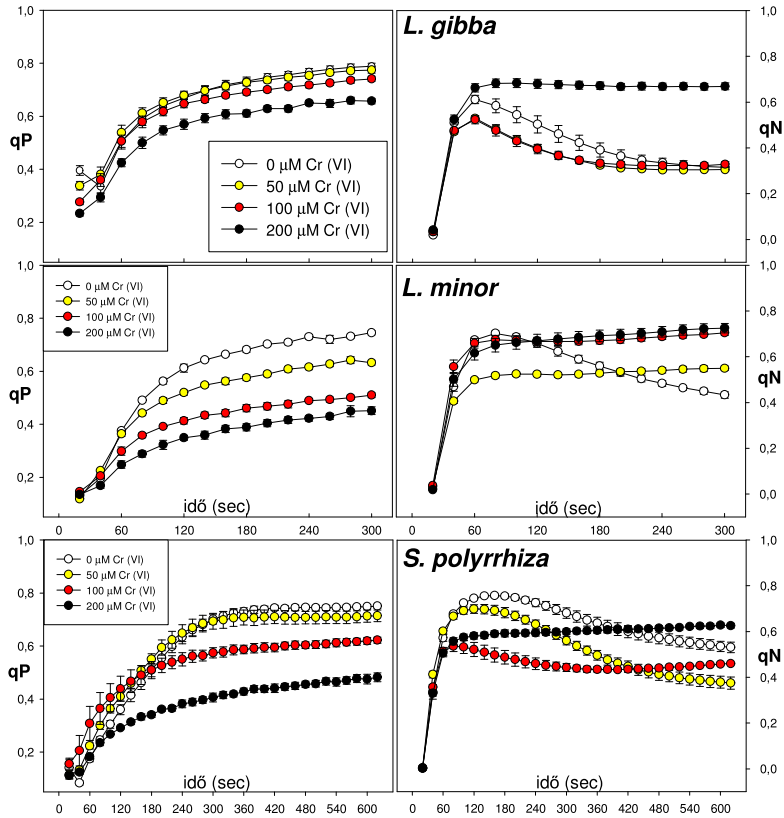
Az eredmények alapján a fényadaptált növényekben mért klorofill fluoreszcencia paraméterek, az 50 μM Cr(VI)-tal kezelt *L. gibba* és *S. polyrrhiza* tenyészetek kivételével, kromátstressz hatására szignifikánsan ($p < 0,001$) nagyobb visszaesést mutattak a sötétadaptált növényekben mértéknél, hasonlóan Juneau és Popovic 1999, Juneau et al. 2002, Lichtenthaler et al. 2005 illetve Oláh et al. 2008a megfigyeléseihez. A

sötétadaptált állapotban mért klorofill fluoreszcencia paraméterek közül az F_m/F_o nagyobb érzékenységgel jelezte a Cr(VI) gátló hatásait, mint az F_v/F_m , hasonlóan más vizsgálatokhoz (Lichtenthaler et al. 2005, Oláh et al. 2005). A fényadaptált növények klorofill fluoreszcencia paramétereinek változását összehasonlítva az alkalmazott Cr(VI)-koncentrációk függvényében a $\Delta F/F_m'$ és RFD eltérő mintázatot mutatott. Az RFD esetében szignifikánsan kisebb visszaesés volt mérhető a *L. gibba* 200 μM Cr(VI)-tal kezelt tenyészeteiben, illetve a *L. minor* esetében minden alkalmazott kromátkoncentrációnál. A *S. polyrrhiza* tenyészeteiben ezzel ellentétben az RFD a $\Delta F/F_m'$ -nél szignifikánsan nagyobb csökkenést mutatott 50 és 100 μM Cr(VI)-hatására. Stressz alatt a mintákban a $\Delta F/F_m'$ és RFD paraméterek gyakran egymástól függetlenül változhatnak, amit az eltérő mérési körülményeknek tulajdoníthatunk (Lichtenthaler et al. 2005). Ez figyelhető meg a *S. polyrrhiza* esetében is, ahol az RFD a *L. minor*tal közel megegyező Cr(VI)-érzékenységet jelzett, míg a $\Delta F/F_m'$ változása alapján inkább a *L. gibba*hoz hasonló volt az érzékenysége.

Az állandó intenzitású megvilágítás hatására a PSII-ben indukálódó fotokémiai és nem-fotokémiai kioltás időbeli lefutása az alkalmazott Cr(VI)-koncentrációk függvényében fajtól függő mintázatot mutatott (12. ábra).

Egészséges növények esetében a fotokémiai kioltás (qP) az aktiváló fény bekapcsolása után telítődési görbét mutatva eléri a maximális értékét, és ez után beáll a körülményeknek megfelelő steady-state állapot. A fotoszintézisben nem hasznosított gerjesztési energia nem-fotokémiai fluoreszcencia (qN) kioltása ezzel szemben az aktiváló fény bekapcsolása után viszonylag gyors (50-150 sec) emelkedést mutat, majd egy lokális maximum elérése után folyamatosan csökken a körülményeknek megfelelő steady-state állapotig (Bolhàr-Nordenkamp és Öquist 1993).

A potenciális és aktuális fotokémiai hatékonyság, illetve az RFD értékek alapján a három faj közül a Cr(VI)-tal szembeni legnagyobb toleranciát a *L. gibba* esetében állapítottuk meg. A többi békalencse-fajhoz viszonyítva a fotokémiai kioltás steady-state értéke 50 illetve 100 μM kromátkezelés hatására, folyamatos aktiváló fényvel történő megvilágítás mellett a kontrollhoz képest kisebb mértékben csökkent. A *L. gibba* esetében a Cr(VI) 200 μM koncentrációban sem okozott drasztikus qP visszaesést (17%, 5. táblázat, 12. ábra). A nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás esetében 50 és 100 μM Cr(VI) egyaránt 13%-kal csökkentette a maximális értékét, de az egyensúlyi értékei a kontrollhoz (qN max: $0,611 \pm 0,037$, qN egyensúly: $0,316 \pm 0,028$) hasonlóan alakultak (5. táblázat, 12. ábra). 200 μM Cr(VI) hatására a *L. gibba* nem-fotokémiai kioltásának a visszaesése teljes mértékben gátlódott.



12. ábra A fotokémiai (qP) és nem-fotokémiai (qN) fluoreszcencia kioltó folyamatok időbeli változása 5 perces, aktiváló fényel történő megvilágítás hatására a *L. gibba* és *L. minor* illetve 10 perces, aktiváló fényel történő megvilágítás hatására a *S. polyrrhiza* teszt-tenyészeteiben, 48 órás Cr(VI)-kezelés után (n=4)

A vizsgált klorofill fluoreszcencia paraméterek alapján a legnagyobb Cr(VI)-érzékenységet a *L. minor* mutatta. Ennél a fajnál aktiváló fény mellett a qP emelkedése az alkalmazott Cr(VI)-koncentrációtól függő mértékben csökkent a mérések során (15, 32 illetve 39%-kal 50, 100 illetve 200 µM Cr(VI) hatására, 5. táblázat, 12. ábra). Cr(VI)-kezelés hatására a nem-fotokémiai klorofill fluoreszcencia kioltás (qN) az aktiváló fény bekapcsolása utáni 1-2 percen elérte a „kvázi” maximális értékét. Az egyensúlyi állapotot elérő fotoszintézis hatásaként várható csökkenés azonban egyik Cr(VI)-koncentrációnál sem következett be. Helyette lassú emelkedés jelentkezett. A kontroll tenyészetekben azonban a qN a megvilágítás 80. másodpercére $0,702 \pm 0,023$ elért maximális értéket követően $0,433 \pm 0,028$ egyensúlyi értékre csökkent (5. táblázat, 12. ábra).

5. táblázat A fotokémiai (qP) és nem-fotokémiai (qN) fluoreszcencia kioltó mechanizmusok hatékonysága, a *L. gibba* és *L. minor* tenyészetekben 5 perces, a *S. polyrrhiza* tenyészetében 10 perces aktiváló fényel történő megvilágítás után, egyensúlyi állapotban (n=4, a kontrollhoz viszonyított fajon belüli eltérések *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001 szinten szignifikánsak)**

Cr(VI) (μ M)	qP		
	<i>L. gibba</i>	<i>L. minor</i>	<i>S. polyrrhiza</i>
0	0,789 \pm 0,023	0,746 \pm 0,015	0,751 \pm 0,014
50	0,775 \pm 0,022	0,633 \pm 0,017***	0,714 \pm 0,044
100	0,741 \pm 0,019*	0,510 \pm 0,018***	0,622 \pm 0,024***
200	0,657 \pm 0,021***	0,451 \pm 0,029***	0,482 \pm 0,033***
Cr(VI) (μ M)	qN		
	<i>L. gibba</i>	<i>L. minor</i>	<i>S. polyrrhiza</i>
0	0,316 \pm 0,028	0,433 \pm 0,028	0,531 \pm 0,045
50	0,305 \pm 0,013	0,549 \pm 0,019***	0,375 \pm 0,053**
100	0,328 \pm 0,021	0,704 \pm 0,021***	0,460 \pm 0,008*
200	0,669 \pm 0,029***	0,725 \pm 0,041***	0,625 \pm 0,021**

A *S. polyrrhiza* vizsgálata során a klorofill fluoreszcencia kioltó folyamatok egyensúlyi állapotának eléréséhez az ötperces megvilágítási idő nem volt elegendő, a fotokémiai és nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltások az alkalmazott megvilágítás mellett 10 perc után álltak be kvázi egyensúlyi állapotba, így az eredmények bemutatása során ezeket az értékeket vettük alapul (12. ábra). A *S. polyrrhiza* esetében a fotokémiai kioltásban a megvilágítási periódus végére 50 és 100 μ M Cr(VI)-koncentráció szignifikánsan, 200 μ M Cr(VI)-koncentráció kisebb, nem szignifikánsan eltérő gátlást okozott a *L. minor*hoz képest kisebb. A *S. polyrrhiza*nál mért csökkenés 5, 17 és 36% volt 50, 100 és 200 μ M Cr(VI) hatására (5. táblázat). A qN időbeli lefutása (12. ábra) alapján elmondható, hogy 50 μ M Cr(VI) egyaránt csökkentette a nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás maximális és egyensúlyi értékét (8 illetve 13%-kal, 12. ábra) a kontrollhoz (qN max: 0,757 \pm 0,014, qN egyensúlyi: 0,531 \pm 0,045) viszonyítva. 100 μ M Cr(VI) hatására a *S. polyrrhiza* nem-fotokémiai kioltásának maximális értéke jelentősen, 29%-kal maradt el a kontrolltól (12. ábra). A maximumot követően egy átmeneti csökkenés következett be, majd az aktiváló megvilágítás 6. percétől a Cr(VI)-kezelt *L. minor* tenyészetekben is megfigyelt lassú, lineáris emelkedés jelentkezett (12. ábra). 200 μ M Cr(VI) hatására, a *L. gibba* tenyészetéhez hasonlóan, a *S. polyrrhiza* esetében is elmaradt a nem-fotokémiai kioltás csökkenése, a 80 sec-nál jelentkező „kvázi” maximum értéke a 100 μ M Cr(VI)-koncentrációnál megfigyelthez megfigyelthez hasonló volt (12. ábra).

A fluoreszcencia kioltó mechanizmusok megoszlásának változása

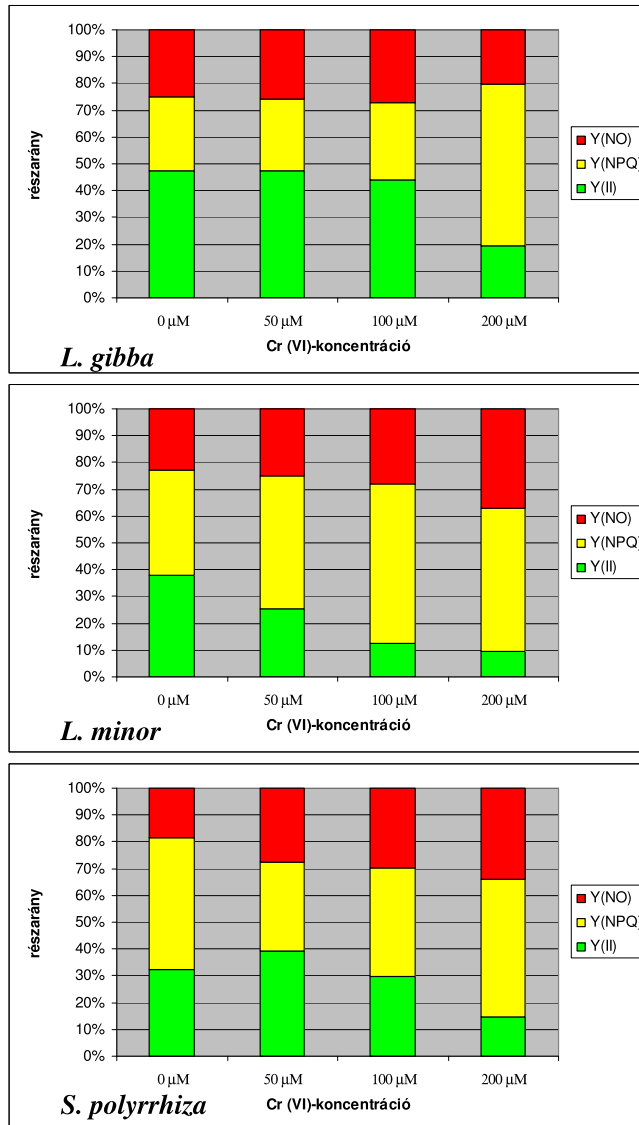
A klorofill fluoreszcencia vizsgálatok során számoltuk a teljes fluoreszcenciahozamból az egyes kioltó mechanizmusok részarányát (ld. Anyag és módszer c. fejezet). A fotokémiai hatékonyság ($\Delta F/F_m' = Y(II)$), a szabályozott (NPQ) és a nem szabályozott (NO) nem-fotokémiai kioltás egymás komplementerjeinek tekinthetők (Klughammer és Schreiber 2008). Ebből következően egy adott részfolyamat intenzitásának az emelkedése a többi mechanizmus részarányának relatív csökkenését eredményezi.

Kromátkezelés során a q_N megvilágítás hatására történő csökkenésének az elmaradása a károsodott fotokémiai rendszerek növekvő számának az eredménye (Ali et al. 2006), amely károsodást a $Y(NO)$ értékének Cr(VI)-koncentrációval arányos emelkedése is jelez (Klughammer és Schreiber 2008).

A vizsgált békalencse fajok közül a klorofill fluoreszcencia paraméterek alapján legkisebb érzékenységet mutató *L. gibba* tenészeiben 200 μM Cr(VI) hatására a q_N a maximális érték elérése után nem mutat csökkenést az aktiváló megvilágítási időszak végére. Az egyes fluoreszcencia kioltó mechanizmusok részarányai alapján ennél a fajnál a jelenség a fotokémiai hatékonyság csökkenésének, illetve ezzel párhuzamosan a szabályozott nem-fotokémiai kioltás 100 μM Cr(VI)-ig gyenge (NS), 200 μM Cr(VI)-nál pedig szignifikáns ($p < 0,001$) erősödésének tulajdonítható. A gerjesztési energia elvezetésében résztvevő harmadik folyamat, a nem szabályozott nem-fotokémiai kioltás (NO) részaránya azonban kromátkezelés hatására nem mutat jelentős változást a kontrollhoz viszonyítva, ami az indukálódó hatékony fényvédő mechanizmusokat feltételezi (13. ábra).

A q_N aktiváló megvilágítás során várható csökkenésének az elmaradása a kromátkezelésekkel szemben legérzékenyebbnek bizonyult *L. minor* tenészetekben minden alkalmazott Cr(VI)-koncentráció hatására megfigyelhető. A *L. minor* esetében a szabályozott nem-fotokémiai kioltás részaránya 100 μM Cr(VI)-ig, a nem szabályozott nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás részaránya minden alkalmazott kromátkezelés hatására szignifikáns ($p < 0,05$) emelkedést mutat, a velük komplementer fotokémiai hatékonyság rovására (13. ábra).

A q_N csökkenésének elmaradását az aktiváló megvilágítási időszak során a *S. polyrrhiza* 100 illetve 200 μM Cr(VI)-tal kezelt tenészeiben is megfigyeltük. A jelenség ebben az esetben is a szabályozott nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok kimerülését, és a fotokémiai hatékonyság csökkenését valószínűsíti. A fenti két mechanizmus részarányának csökkenésével párhuzamosan a $Y(NO)$ az alkalmazott kromátkezelésekkel arányosan szignifikáns ($p < 0,01$) emelkedést mutatott (13. ábra).



13. ábra A fotokémiai hatékonyság (Y II), a szabályozott -Y(NPQ)- illetve a nem-szabályozott -Y(NO)- klorofill fluoreszcencia kioltó folyamatok egymáshoz viszonyított százalékos arányának változása a három békalencse-faj teszt-tenyészeteiben, 48 órás króm(VI)-kezelést követően

A Cr(VI) hatása a gyors fényválaszokra

A vizsgált növények fotoszintézise az alkalmazott aktiváló fény intenzitásának fokozatos emelésével is jellemezhető. A vizsgálataink során

azt a módszert alkalmaztuk, amelynél az egyes fényintenzitásoknak megfelelő megvilágítási „lépcsők” időtartama túl rövid az aktuális körülményeknek megfelelő steady state fotoszintézis kialakulásához. Az ilyen módon nyerhető, az elektrontranszport folyamatok (ETR) sebességét tükröző ún. gyors fényválasz-görbék (RLC = Rapid Light Curve) alapján lehetőség van a fotoszintézis indukálhatóságának jellemzésére a gyorsan és tág határok között változó megvilágítási viszonyok mellett (Ralph és Gademan 2005, Serôdio et al. 2006). A módszer alkalmazása során kapott eredmények az ETR illetve a fotoszintézis teljes folyamatának adott körülmények között mért aktuális állapotát tükrözik, ellentétben a „hagyományos” (i.e. steady state állapot eléréséig tartó megvilágítási lépcsők) alkalmazó fényválasz-görbékkel (ú.n. „P-E görbék”). Az ETR gyors fényválasz-görbéinek lefutása jellemzően három nagyobb szakaszra osztható (Ralph és Gademan 2005, Serôdio et al. 2006, ld. 3.2.1 fejezet 7. ábrája):

1. Fénylimitált szakasz: a fotoszintézis hatékonyságát a megvilágítás erőssége határozza meg, az elektron transzport ráta (ETR) az aktiváló fény intenzitásával egyenes arányban emelkedik. Az elektrontranszport maximális fényhasznosítási hatékonyságát a görbe kezdeti meredekségével jellemezhetjük, számértéke az ún. fotonhasznosítási együttható (α).

2. Fénytelített szakasz: a fotokémiai rendszerek által még tolerálható fényintenzitáson az elektrontranszport lánc teljesítménye korlátozza a fotoszintézis hatékonyságának további lineáris javulását. A kezdeti lineáris szakasz után az ETR-görbe emelkedésének a meredeksége fokozatosan csökken a maximális érték (ETR_{max}) eléréséig.

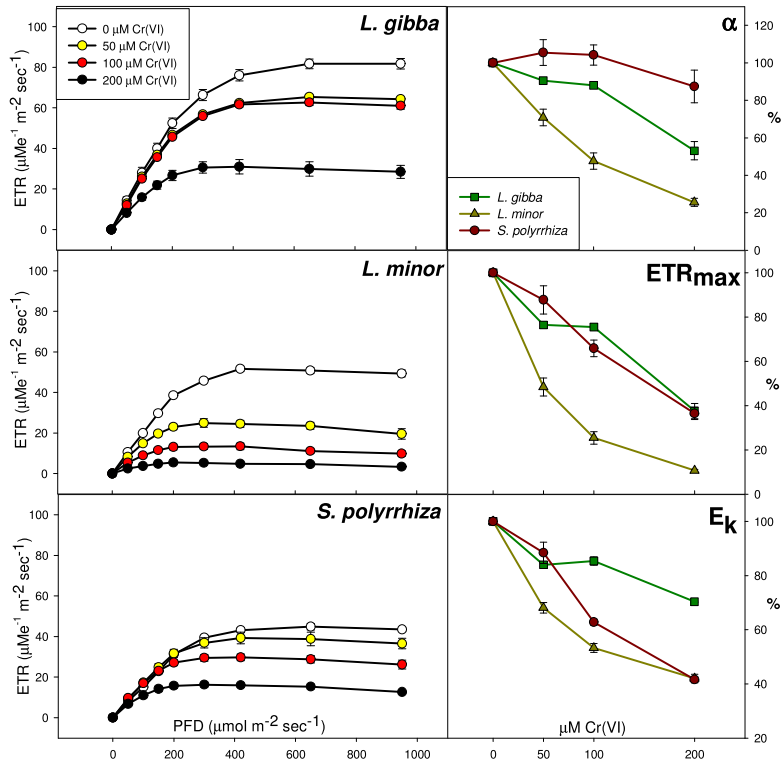
3. Fotoinhibíciós szakasz: az aktiváló fény intenzitásának további emelése sok esetben az elektrontranszport ráta csökkenését eredményezi. Ez a hagyományos módszerrel meghatározható P-E fényválasz-görbék esetében kimutatható, és legvalószínűbben a fotoinhibíció eredménye. Az ún. gyors fényválaszok mérése során azonban a rövid megvilágítási idő nem teszi lehetővé a fotoinhibíció kifejlődését, így a csökkenést inkább a PSII dinamikus leszabályozásának tulajdoníthatjuk (Ralph és Gademan 2005).

Az elektrontranszport maximális fotonhasznosítási együtthatója (α) a vizsgált három békalencse-faj kontroll tenyészeinél eltérően alakult. Az aktuális megvilágításhoz legdinamikusabban ($\alpha=0,267\pm0,029$) a *L. gibba* kontroll tenyészetei alkalmazkodtak, (14. ábra). A *L. minor* tenyészeteinek α értékei ennél alacsonyabbak ($\alpha=0,196\pm0,003$) (14. ábra). A legkisebb hatékonysággal ($\alpha=0,155\pm0,012$) a *S. polyrrhiza* kontroll növényei alkalmazkodtak a nem-telítő megvilágítás erősödéséhez (14. ábra).

A fénylimitált elektrontranszportához hasonlóan az elektrontranszport fénytelítési értéke (ETR_{max}) is fajtól függő értéket mutatott (14. ábra). Az ETR_{max} értékek az α -értékekhez hasonlóan a *L. gibba* kontroll növényeiben voltak a legmagasabbak ($81,7\pm4,1 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). A *L. minor* illetve *S.*

polyrrhiza kontroll tenyészteteiben az előzőnél kisebb ETR_{max} ($51,6 \pm 2,2$ illetve $44,8 \pm 2,7 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) volt mérhető (14. ábra).

A fényteltési együttható (E_k) a három faj kontroll tenyészteteiben az előző két paraméternél kisebb, interspecifikus eltéréseket mutatott (14. ábra). A legmagasabb fényteltési együttható a *L. gibba* kontroll növényeire volt jellemző ($308 \pm 19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). A *S. polyrrhiza* kontroll tenyésztetei ezzel közel azonos E_k értékeket ($291 \pm 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) mutattak, míg a legalacsonyabb E_k értékek a *L. minorra* voltak jellemzők ($264 \pm 15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).



14. ábra Az elektron transzport ráták (ETR) változása az aktiváló fény erősségének függvényében (bal oldalon), és az ETR-görbék jellemző paramétereinek kontrollhoz viszonyított értékei a három vizsgált békalencse-faj teszt-tenyészteteiben, a kontroll százalékában, 48 órás Cr(VI)-kezelést követően (az egyes fényintenzitás-lépcsők időtartama 60 sec) (n=3)

48 órás Cr(VI)-kezelések hatására a gyors fény-válasz görbék (RLC) kezdeti, lineáris szakaszának meredeksége és hossza (i.e. a fénylimitált szakasz jellemzői) a vizsgált békalencse-fajoknál megváltozott, a változások

fajtól függő mintázatot mutattak (14. ábra). Az elektrontranszport maximális fotonhasználási együtthatója (α) a króm(VI)-kezelések végére a legnagyobb mértékben a *L. minor* tenyészeteiben esett vissza (14. ábra). A csökkenés 50 μM Cr(VI)-nál 29%-os ($p < 0,01$), 100 μM Cr(VI)-nál 53%-os, 200 μM Cr(VI)-nál 75%-os volt (mindkét esetben $p < 0,001$). Ennél a fajnál az elektrontranszport maximális értékének a visszaesése még drasztikusabbnak bizonyult. Az ETR_{max} értékek 52, 75 illetve 89%-kal csökkentek a kontroll értékekhez képest. 50, 100 és 200 μM Cr(VI) hatására a kezdeti (α) illetve a maximális hatékonyság (ETR_{max}) visszaesésével párhuzamosan a *L. minor* fényteltési együtthatója (E_k) is szignifikánsan lecsökkent. A króm(VI)-kezelések 48. órájában 32, 47 illetve 58%-os csökkenés volt mérhető 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására (14. ábra).

A *S. polyrrhiza* króm(VI)-kezelt tenyészeteiben az elektrontranszportnak a kontroll tenyészetekben is tapasztalt lassú indukciója miatt az α -értékek csupán 200 μM Cr(VI) hatására mutattak kisebb mértékű, nem szignifikáns visszaesést (13%, 14. ábra). Az elektrontranszport ráta maximális értéke azonban 12 (NS), 34 illetve 64%-kal csökkent a 48 órás 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI)-kezelések végére (14. ábra). Az ETR_{max} gátlásának következtében az E_k értékek 17 (NS), 37 illetve 58%-kal voltak alacsonyabbak a kontrollhoz viszonyítva (14. ábra).

A *L. gibba* kromátérzékenysége a gyors fényválasz paraméterek változása alapján a *S. polyrrhizához* hasonlóan mutatkozott (14. ábra). Az α -értékek 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására történő 9 (NS), 12 (NS) illetve 49%-os visszaesése ugyan a *S. polyrrhizához* képest nagyobb, az ETR_{max} csökkenése azonban csak 200 μM Cr(VI) hatására egyezik meg a *S. polyrrhiza* azonos Cr(VI)-koncentrációval kezelt tenyészeteinek értékével (63%). 50 μM Cr(VI) hatására a gátlás nagyobb (24%-os), 100 μM Cr(VI) hatására kisebb (25%-os) volt, mint a *S. polyrrhiza* esetében (14. ábra). A *L. gibba* kromátkezelt tenyészeteiben a sötétadaptált illetve folyamatos aktiváló fényvel megvilágított növényekben mért klorofill fluoreszcencia paraméterek eredményeihez hasonlóan az 50 és 100 mM Cr(VI)-koncentrációk gátló hatása között nem mértünk szignifikáns eltérést. A Cr(VI)-kezelések hatására a *L. gibba* fényteltési együtthatója (E_k) 16 (50 μM $p < 0,05$), 15 (100 μM $p < 0,05$) illetve 30%-os (200 μM $p < 0,01$) csökkenést mutatott a kontrollhoz viszonyítva (14. ábra). Ezek az E_k -értékek a három vizsgált faj közül a *L. gibba* esetében jelezték az ETR fénylimitált szakaszának a legkisebb mértékű gátlását (14. ábra).

4.1.3. A fotoszintetikus pigmenttartalom változásai

Rövid-távú króm(VI)-kezelésekben mértük a teszt növényekben a fotoszintetikus pigmentek mennyiségének a változását, illetve a

pigmentösszetétel és a klorofill fluoreszcencia paraméterek változásai közötti összefüggéseket. Saját korábbi eredmények (Oláh et al. 2008b, Oláh et al. 2008c), illetve az irodalmi adatok alapján (Bassi et al. 1990, Appenroth et al. 2001, Cervantes et al. 2001, Panda és Choudhury 2005, Sinha et al. 2005) kromátkezelés hatására hosszabb távon minden fotoszintetikus pigment mennyisége csökken, míg bizonyos védő hatású karotinoidok (VAZ-pool elemei, β -karotin) mennyisége megemelkedik (Nichols et al. 2000, Appenroth et al. 2001, Panda és Choudhury 2005, Sinha et al. 2005). A hosszabb távú, többnapos kromátkezelések során azonban a kromátstressz másodlagos hatásai (pl. a klorofillszintézis gátlása), a növényekben indukálódó védekező folyamatok „elfedhetik” a króm(VI) elsődleges hatásait, illetve a pigmenttartalmak csökkenése olyan mértékű lehet, ami megakadályozhatja a részletesebb elemzéseket. Összehasonlítva a *S. polyrrhiza*ra vonatkozó, az ebben a fejezetben bemutatott 48 órás tesztek eredményeit a saját (Oláh et al. 2008b) ötnapos kezelésekre vonatkozó eredményekkel, a fotoszintetikus pigmenttek mennyiségének jelentős visszaesése tapasztalható a kromátkezelések 2. és 5. napja között. Susplugas et al. (2000) eredményei alapján a *S. polyrrhiza* összklorofill-tartalma 7 nap alatt már 10-40 μM Cr(VI) jelenlétében is jelentősen csökken.

A Cr(VI)-kezelések már 48 óra alatt is befolyásolták a növények pigmenttartalmát, de kisebb, a legtöbb esetben nem szignifikáns interspecifikus különbségeket és koncentrációktól függő hatásokat tapasztaltunk, mint a klorofill fluoreszcencia paraméterek esetében, a tesztek rövid időtartama miatt.

A klorofill fluoreszcencia paraméterek változása alapján a három békalencse-faj közül legkisebb Cr(VI)-érzékenységet mutató *L. gibba* teszt növényeiben a kl-*a* frisstömegre vonatkoztatott mennyisége 48 óra alatt 9, 18 illetve 22%-kal, míg a kl-*b* mennyisége 6, 14 illetve 14%-kal csökkent 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására (6. táblázat). A kl-*a* illetve kl-*b* külön-külön is csökkenő tendenciájával egyezően az összklorofill-tartalom (kl+*b*) 9, 17 illetve 20%-kal, míg a karotinoidok összes mennyisége 7, 13 (NS) illetve 16%-kal csökkent 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására a kezeléseik végére (6. táblázat). Az egyes pigmentek eltérő érzékenysége miatt a 48 órás, 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI)-kezelés a kl/*a*+*b* arányban 3, 5 illetve 9%-os csökkenést okozott. A kar/kl+*a*+*b* arány 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására kismértékben emelkedett (5 illetve 4%) a *L. gibba* tenyészeteiben (6. táblázat).

6. táblázat A *L. gibba* teszt-tenyészetek fotoszintetikus pigment tartalma a rövid-távú Cr(VI)-kezelések 48. órájában (n=3, a kontrollhoz viszonyított fajon belüli eltérések ⁺p<0,1, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 szinten szignifikánsak)

Cr(VI) (μM)	kl-a (mg g_n^{-1})	kl-b (mg g_n^{-1})	kl-a/b (mg mg^{-1})
0	0,994±0,031	0,312±0,010	3,18±0,04
50	0,900±0,027*	0,292±0,008*	3,08±0,03**
100	0,813±0,081**	0,269±0,025*	3,02±0,06**
200	0,776±0,050***	0,270±0,016**	2,88±0,02**
Cr(VI) (μM)	kl-a+b (mg g_n^{-1})	kar (mg g_n^{-1})	kar/kl-a+b (mg mg^{-1})
0	1,31±0,01	0,291±0,012	0,223±0,006
50	1,19±0,04**	0,270±0,006*	0,226±0,002
100	1,08±0,11*	0,254±0,028 ⁺	0,234±0,003*
200	1,05±0,07**	0,243±0,013**	0,232±0,003*

A klorofill fluoreszcencia paraméterek alapján a három vizsgált békalencse-faj közül a legnagyobb Cr(VI)-érzékenységet mutató *L. minor* tenyészteteiben a *L. gibba*hoz hasonlóan minden alkalmazott Cr(VI)-koncentráció a fotoszintetikus pigmenttartalom csökkenését okozta (7. táblázat). 50 μM Cr(VI) hatására a másik két békalencse-fajnál nagyobb, 17 illetve 12%-os visszaesés volt mérhető a kl-a illetve kl-b mennyiségében. 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására a csökkenés mértéke már csak kisebb, a *L. gibba*hoz hasonló mértékű volt (19 és 22% illetve 12 és 16% a kl-a illetve kl-b mennyiségében 100 és 200 μM Cr(VI) hatására).

7. táblázat A *L. minor* teszt-tenyészetek fotoszintetikus pigment tartalma a rövid-távú Cr(VI)-kezelések 48. órájában (n=3, a kontrollhoz viszonyított fajon belüli eltérések ⁺p<0,1, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 szinten szignifikánsak)

Cr(VI) (μM)	kl-a (mg g_n^{-1})	kl-b (mg g_n^{-1})	kl-a/b (mg mg^{-1})
0	0,871±0,060	0,253±0,015	3,44±0,03
50	0,726±0,042*	0,224±0,010*	3,24±0,07**
100	0,706±0,025**	0,223±0,011*	3,16±0,07***
200	0,681±0,036**	0,213±0,014*	3,21±0,05**
Cr(VI) (μM)	kl-a+b (mg g_n^{-1})	kar (mg g_n^{-1})	kar/kl-a+b (mg mg^{-1})
0	1,12±0,08	0,255±0,016	0,227±0,001
50	0,950±0,052*	0,228±0,015 ⁺	0,240±0,005**
100	0,929±0,036*	0,226±0,006*	0,243±0,005***
200	0,894±0,050**	0,215±0,002**	0,241±0,012*

A *L. minor* 50 μM Cr(VI) jelenlétében mutatott nagyobb érzékenysége a klorofilok összes mennyiségének (15%-os visszaesés) illetve az összkarotinoid-tartalomnak a csökkenésében (10%) is mérhető volt (7. táblázat). 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására a csökkenés mértéke már a *L.*

gibbához hasonlóan, 17 és 21%-os volt a *kl+a+b*, illetve 11 és 16%-os volt az összkarotinoid-tartalom esetében. A *kl-a* és *kl-b*, illetve a PSI és PSII eltérő érzékenységének köszönhetően a *L. minor klalb* arányának csökkenése 6, 8 illetve 7%-os volt, míg a *kar/kl+a+b* arányának növekedése 6, 7 illetve 6%-os volt 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására (7. táblázat).

A fotoszintetikus pigmentek mennyisége króm(VI)-kezelés hatására a legkisebb mértékben a *S. polyrrhiza* tenyészeteiben változott (8. táblázat). A *kl-a* frisstömegre vonatkoztatott koncentrációja 100 és 200 μM Cr(VI) hatására is csupán 9 és 18%-kal csökkent 48 óra alatt, míg a *kl-b* mennyisége 50 μM és 100 μM Cr(VI) hatására a kontrollhoz hasonló értékeket mutatott (8. táblázat). A *kl-b* 11%-os csökkenése a *S. polyrrhizánál* 200 μM Cr(VI) hatására következett be. A *L. gibbánál* és *L. minornál* ugyanilyen visszaesést már 100 μM -os Cr(VI)-kezelés is kiváltott. A *S. polyrrhiza* tenyészetekben a klorofilok összes mennyiségének csökkenése mellett a teljes karotinoid tartalom is visszaesést mutatott, de a mértéke elmaradt a *L. gibba* illetve *L. minor* esetében mérttől. A *kl+a+b* 8 (NS) illetve 16%-kal, míg a karotinoid tartalom 4 illetve 10%-kal maradt el a kontroll (*kl+a+b*: $1,268 \pm 0,046 \text{ mg g}_{\text{ft}}^{-1}$, *kar*: $0,261 \pm 0,012 \text{ mg g}_{\text{ft}}^{-1}$) értékétől 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására (8. táblázat). A másik két vizsgált békalencse-fajhoz hasonlóan a *kl-b* mennyiségének a *kl-a*-hoz viszonyítva kisebb mértékű csökkenése a *klalb* arányában is csökkenést eredményezett, mely a *L. gibbánál* és *L. minornál* tapasztalhatóhoz hasonló mértékű, 4, 6 illetve 8%-os volt 50, 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására (8. táblázat). A karotinoidoknak az összklorofill-tartalomhoz viszonyított aránya 50 μM Cr(VI) hatására nem tért el a kontroll ($0,206 \pm 0,002 \text{ mg mg}^{-1}$) értékétől, míg 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására 4 (NS) illetve 8%-kal magasabb volt (8. táblázat).

8. táblázat A *S. polyrrhiza* teszt-tenyészetek fotoszintetikus pigment tartalma a rövid-távú Cr(VI)-kezelések 48. órájában (n=3, a kontrollhoz viszonyított fajon belüli eltérések * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ szinten szignifikánsak)

Cr(VI) (μM)	<i>kl-a</i> ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)	<i>kl-b</i> ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)	<i>klalb</i> (mg mg^{-1})
0	$0,979 \pm 0,037$	$0,289 \pm 0,010$	$3,382 \pm 0,017$
50	$0,962 \pm 0,032$	$0,296 \pm 0,012$	$3,257 \pm 0,055^*$
100	$0,887 \pm 0,033^*$	$0,280 \pm 0,010$	$3,172 \pm 0,054^{**}$
200	$0,803 \pm 0,015^{***}$	$0,258 \pm 0,009^{**}$	$3,111 \pm 0,049^{***}$
Cr(VI) (μM)	<i>kl+a+b</i> ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)	<i>kar</i> ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)	<i>kar/kl+a+b</i> (mg mg^{-1})
0	$1,268 \pm 0,046$	$0,261 \pm 0,012$	$0,206 \pm 0,002$
50	$1,258 \pm 0,042$	$0,258 \pm 0,019$	$0,205 \pm 0,017$
100	$1,166 \pm 0,042^*$	$0,250 \pm 0,022^*$	$0,215 \pm 0,012$
200	$1,061 \pm 0,024^{**}$	$0,235 \pm 0,006^{***}$	$0,222 \pm 0,001^{***}$

A vizsgált békalencse-fajok összklorofill- és összkarotinoid-tartalmában 50 μM Cr(VI) a legnagyobb visszaesést a *L. minor* tenyészeteiben okozta a 48 órás króm(VI)-kezelések végére. 100 illetve 200 μM Cr(VI) hatására a *L. gibba* és a *L. minor* érzékenysége között statisztikailag nem mértünk különbséget. Mindkét faj tenyészeteiben 100 μM Cr(VI) már olyan jelentős gátlást eredményezett, hogy a további kromátkoncentráció emelkedés (200 μM) a rövid kezelési időnek köszönhetően nem okozott szignifikáns visszaesést. A *S. polyrrhiza* tenyészeteiben ezzel szemben 50 és 100 μM Cr(VI) hatására az összklorofill- illetve összkarotinoid-tartalomban nem, vagy csak kismértékű csökkenés volt tapasztalható, míg 200 μM Cr(VI) hatására a *S. polyrrhizában* a fotoszintetikus pigmentek koncentrációja közel megegyezett a *L. gibba* és *L. minor* esetében 100 μM Cr(VI)-kezelés mellett mért értékekkel.

Mindhárom békalencse-fajnál megfigyelhető, hogy rövidtávon a Cr(VI) elsősorban a *kl-a* mennyiségét csökkentette, míg a *kl-b* mennyiségi változása csak kisebb gátlást jelzett. Vízinövények klorofilltartalmának csökkenését Cr(VI)-kezelés hatására több szerző leírta, pl. Bassi et al. (1990), Appenroth et al. (2001), Oláh et al. (2005), Oláh et al. (2008a), Oláh et al. (2008b). Appenroth et al. (2001) eredményei alapján a *S. polyrrhiza* növényekben a *kl-a* mennyisége 10 nap alatt már 50 μM Cr(VI) hatására is jelentősen csökkent, de magasabb koncentrációjú, 100 és 200 μM -os Cr(VI) kezelések esetében a *kl-a* tartalom nem mutatott jelentős eltérést. Az összkarotinoid-tartalom mindhárom vizsgált fajnál csökkent a króm(VI)-kezelések hatására, azonban a csökkenés az összklorofill-tartalomnál kisebb volt, hasonlóan Nichols et al. (2000), Appenroth et al. (2001), Oláh et al. (2005), Oláh et al. (2008b) eredményeihez. A különbség a karotinoidok króm(VI)-tal szembeni kisebb érzékenységét, illetve az oxidatív stressz kivédésére a fotokémiai rendszerek megnövekedett karotinoid-igényét jelzi (Li és Xiong 2003, Panda és Choudhury 2005, Oláh et al. 2008a, Oláh et al. 2008b). A Cr(VI)-kezelések 48. órájára a klorofill fluoreszcencia paraméterek nagyobb visszaesést mutattak, mint a fotoszintetikus pigmentek koncentrációja. E különbség alapján arra lehet következtetni, hogy a Cr(VI) támadáspontja a PSII-ben elsősorban a reakciócentrumokban található, míg az antennapigmentek sérülése kisebb mértékű (Ali et al. 2006), amit az Fm értékének az Fo-nál nagyobb változása, illetve a Y(NO) részarányának emelkedése is jelzett a fotokémiai illetve szabályozott nem-fotokémiai kioltás rovására (ld. 4.1.1 fejezet, Serôdio et al. 2006). A működőképes reakciócentrumok számának csökkenése miatt növekszik az egy reakciócentrumra eső átlagos antennaméret. A felesleges gerjesztési energia elvezetését, illetve az oxidatív stressz kivédését a nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok (qN) részarányának növekedése jelzi, párhuzamosan a

kar/kla+b arány emelkedésével (Li és Xiong 2003, Panda és Choudhury 2005, Ali et al. 2006, Oláh et al. 2008a, Oláh et al. 2008b).

4.2. Az antociánok lehetséges szerepének vizsgálata különböző *S. polyrrhiza* ökotípusok Cr(VI)-toleranciájában

A békalencse-félék világszerte elterjedt fajok. Bár az elterjedésükben a vegetatív szaporodás dominál (Vasseur et al. 1993), a változatos környezeti feltételekhez való alkalmazkodásnak köszönhetően fajon belül is viszonylag nagy változékonyság alakult ki (Vasseur et al. 1993, Jansen et al. 1999, Bergmann et al. 2000, Sobrero et al. 2004, Crawford et al. 2005).

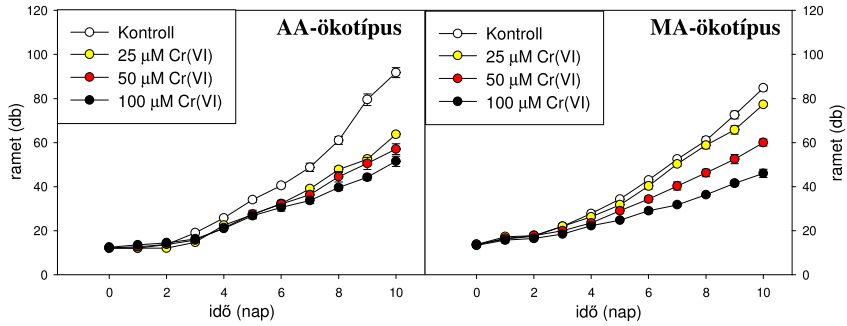
A 4.2 fejezetben a DE TTK Növénytani Tanszéken fenntartott két különböző *S. polyrrhiza* ökotípus (Oláh et al. 2008c, Oláh et al. 2009a) Cr(VI)-toleranciája közötti eltérésekkel, illetve az e fajra jellemző antocián-felhalmozásnak az oxidatív stresszel szembeni védelemben játszott lehetséges szerepével foglalkozunk. Célunk volt az is, hogy megvizsgáljuk, vajon alkalmazható-e a *S. polyrrhiza* antocián-felhalmozása általános biomarkerként, illetve az alkalmazhatósága esetén egyszerű, lehetőleg *in vivo* használható módszert dolgozzunk ki.

4.2.1. Az ökotípusok növekedési paraméterei

A tenyészetek rametszámának változása

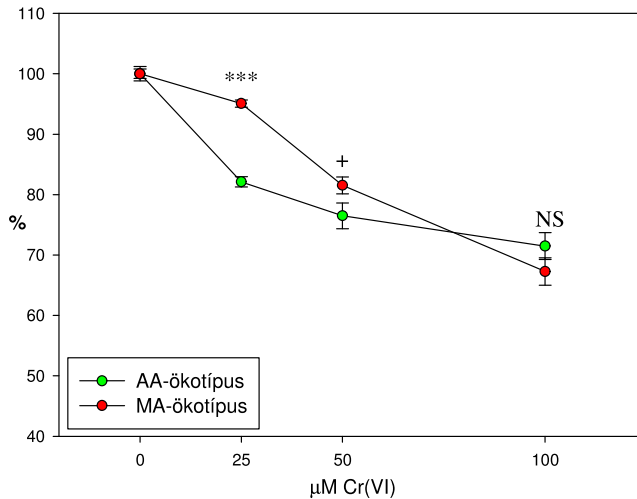
A két *S. polyrrhiza* ökotípus Cr(VI)-toleranciájának összehasonlításához a 4.1 fejezet eredményei alapján 100 μ M Cr(VI) alkalmazása megfelelőnek bizonyult. A fajon belüli különbségek jobb felméréséhez és a tervezett módszer kidolgozása miatt azonban attól alacsonyabb, 25 illetve 50 μ M-os Cr(VI)-kezelések alkalmazását is szükségesnek láttuk.

A *S. polyrrhiza* két (AA és MA) ökotípusának azonos körülmények között nevelt kontroll tenészeiben szignifikánsan ($p < 0,01$) eltérő növekedési sebességet figyeltünk meg (15. ábra). Az AA-ökotípus kontroll tenészeinél az össz-rametszám a tesztek 10. napjára átlagosan 92 db ($RGR = 0,203 \pm 0,005$), az MA-ökotípusnál ennél mintegy 10%-kal alacsonyabb, átlagosan 84 db ($RGR = 0,184 \pm 0,011$) volt (15. ábra).



15. ábra A *S. polyrrhiza* AA- (balra) illetve MA-ökotípusának (jobbra) kontroll és króm(VI)-kezelt tenyésztéseiben az össz-rametszám változása a tesztek 10 napja során (n=4)

A tenyészetek rametszámát minden alkalmazott króm(VI)-koncentráció befolyásolta, a gátlás alapján azonban a két ökotípus eltérő érzékenységet mutatott az alacsonyabb kromátkoncentrációkkal szemben (16. ábra).



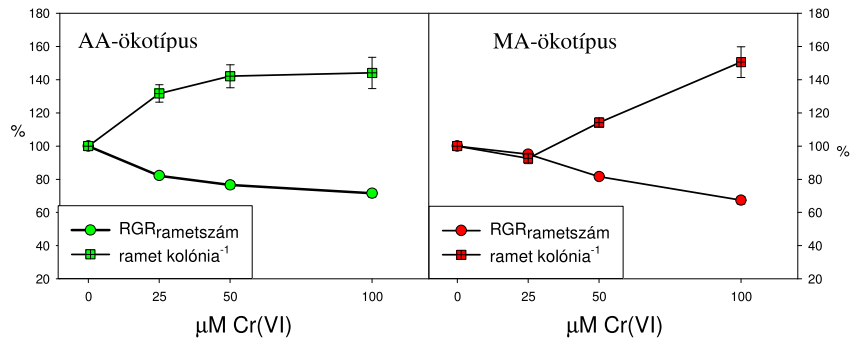
16. ábra A *S. polyrrhiza* AA- és MA-ökotípusok tenyésztéseinek össz-rametszáma alapján számolt növekedési ráták a tesztek 10. napján, a kontroll értékek százalékában (n=4, a két ökotípusnál azonos kromátkoncentráció mellett mért gátlások közti különbségek $^+p \leq 0,1$, $^{***}p < 0,001$ szinten szignifikánsak)

Az AA-ökotípus össz-rametszám növekedési rátáját a tesztek során a króm(VI) 25 µM esetében 18%-kal, 50 µM esetében 23%-kal, 100 µM esetében pedig 28%-kal gátolta. Az 50 és 100 µM Cr(VI)-koncentrációk hatása közötti különbség azonban nem bizonyult szignifikánsnak. Meg kell

jegyeznünk, hogy az AA-ökotípus össz-rametszám alapján számolt RGR értéke az egymástól független kísérletek miatt valamivel magasabb volt a 4.2.1 fejezetben ($RGR=0,203\pm 0,005$) bemutatott eredményekben, mint a 4.1.1 fejezetben ($RGR=0,185\pm 0,007$). A gátlás mértéke azonban $100\ \mu\text{M}$ Cr(VI)-nál nagyon hasonló, 25 illetve 29%-os volt a két méréssorozatban (a Student-féle t-próba alapján $p=0,463$).

Az MA-ökotípus tenyészteteiben az össz-rametszám növekedésében mutatkozó gátlás a legalacsonyabb, $25\ \mu\text{M}$ Cr(VI)-koncentrációnál jóval kisebb mértékű ($p<0,001$) volt, mint az AA-ökotípusnál, és $50\ \text{mM}$ esetében is gyenge szignifikanciával ($p<0,1$), de alacsonyabbnak bizonyult (16. ábra). A tesztek 10. napjára az össz-rametszám növekedési rátája $25\ \mu\text{M}$ Cr(VI) mellett 5%-kal, $50\ \mu\text{M}$ Cr(VI) mellett 18%-kal, míg $100\ \mu\text{M}$ Cr(VI) esetében 33%-kal maradt el a kontroll tenyésztetek értékeitől (16. ábra).

Mindkét ökotípusnál megfigyelhető volt, hogy a króm(VI)-kezelések hatására nemcsak az új rametek képződése lassult le, hanem a kolóniák szétválása is. Emiatt a kezelési idő előrehaladtával egyre több rametet tartalmazó kolóniák fejlődtek (ld. még 4.1.1 fejezet). Ennek eredményeként a növekedési ráták csökkenésével közel arányosan emelkedett a kolóniánkénti rametszám (17. ábra).



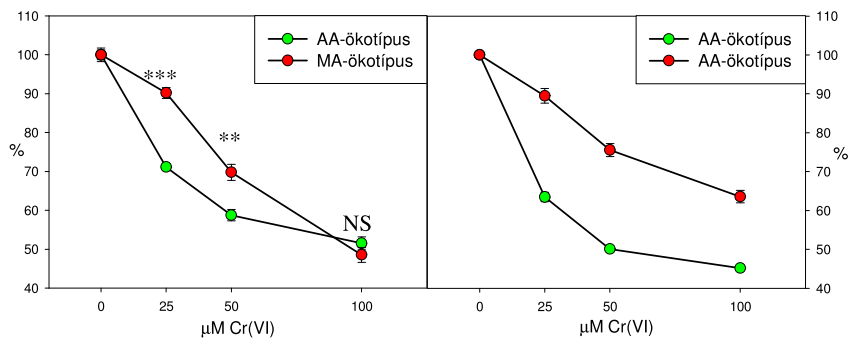
17. ábra A *S. polyrrhiza* AA- és MA-ökotípusok össz-rametszám alapján számolt relatív növekedési rátája és kolóniánkénti átlagos rametszáma a tesztek 10. napján, a kontroll értékek százalékában ($n=4$)

A ramet/kolónia arány emelkedése az AA-ökotípusnál már $25\ \mu\text{M}$ Cr(VI)-nál bekövetkezett. Az ettől magasabb és emelkedő króm(VI) koncentrációk hatására azonban, az össz-rametszámokhoz hasonlóan, a ramet/kolónia arány nem mutatott szignifikáns változást (17. ábra). Ugyanakkor az MA-ökotípusnál a ramet/kolónia arány átlagértéke a $25\ \mu\text{M}$ Cr(VI)-tal kezelt tenyésztetekben a kontroll értékekkel közel megegyező volt. Az 50 és $100\ \mu\text{M}$ króm(VI) hatására viszont a ramet/kolónia arány jelentősen meghaladta a kontroll értéket (17. ábra).

A tenyészetek levélfelületének változása

A két ökotípus azonos körülmények között nevelt kontroll tenyésztetei a rametszámokhoz hasonlóan az össz-levélfelületek alapján is eltérő gyarapodási ütemet mutattak. Az AA-ökotípus kontroll tenyészteteiben az átlagos össz-levélfelület a tesztek 10. napjára elérte a $16,2 \pm 1,2 \text{ cm}^2$ ($\text{RGR}=0,283 \pm 0,007$), míg az MA-ökotípusnál a lassabb növekedés eredményeként a 10. napra átlagosan $9,8 \text{ cm}^2 \pm 0,7 \text{ cm}^2$ ($\text{RGR}=0,207 \pm 0,007$) össz-levélfelület volt jellemző. Ezek az értékek a két ökotípus levélfelület gyarapodási ütemének ~30%-os eltérését mutatják az AA-ökotípus javára ($p < 0,001$).

Az AA-ökotípus esetében a króm(VI) gátló hatását a levélfelületre már a 3-4. napon megfigyeltük (az eredmények nincsenek feltüntetve). A kezelések 10. napján történt kiértékelések (18. ábra) alapján megállapítható, hogy a levélfelület növekedési ráta $25 \mu\text{M Cr(VI)}$ esetében 30%-kal, $50 \mu\text{M}$ esetében 40%-kal, $100 \mu\text{M}$ mellett pedig 50%-kal maradt el a kontroll értékétől. A rametszámokkal ellentétben a levélfelület RGR alapján számolt gátlások a 25 és 50 illetve 50 és $100 \mu\text{M Cr(VI)}$ -kezelések összehasonlításakor is szignifikáns különbséget mutattak.



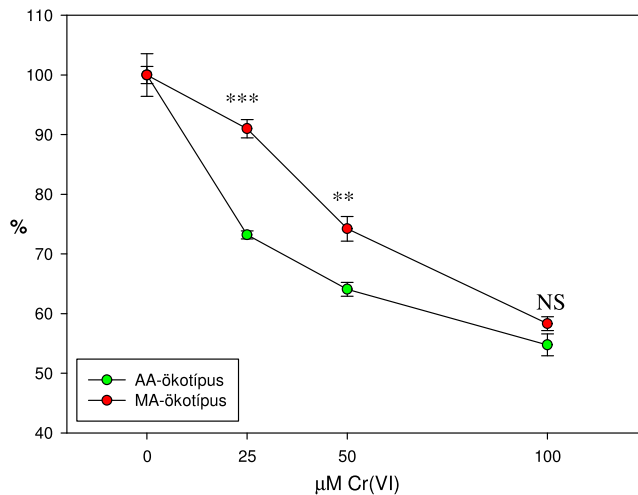
18. ábra A *S. polyrrhiza* AA- és MA-ökotípusok Cr(VI)-tal kezelt tenyészteteinek levélfelülete alapján számolt növekedési ráták gátlása (balra), és egy ramet átlagos felülete (jobbra) a tesztek 10. napján, a kontroll értékek százalékában ($n=4$, a két ökotípusnál azonos kromátkoncentráció mellett mért gátlások közti különbségek ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ szinten szignifikánsak)

Az MA-ökotípus tenyészteteiben a króm(VI)-kezelések hatására a levélfelület növekedési üteme a tesztek 3-4. napjától szintén lassult. Az alacsonyabb (25 - $50 \mu\text{M}$) Cr(VI)-koncentrációk esetében a kontrollhoz képest a gátlás azonban jóval kisebb mértékű volt, mint az AA-ökotípusnál (18. ábra). A levélfelület alapján számolt növekedési ráta a tesztek 10. napjára $25 \mu\text{M Cr(VI)}$ mellett 10%-kal, $50 \mu\text{M Cr(VI)}$ -nál 30%-kal, míg $100 \mu\text{M Cr(VI)}$ esetében 50%-kal volt alacsonyabb a kontroll értékénél (18. ábra).

A levélfelület növekedési ráták mindkét ökotípus esetében nagyobb érzékenységet mutattak a Cr(VI)-tal szemben, mint a rametszám alapján számolt növekedés. Ez az eltérés egyértelműen rámutat arra, hogy Cr(VI) jelenlétében kisebb levelek fejlődtek (ld. 4.1.1 fejezet, illetve Eberius 2001b, Naumann et al. 2007). A „levélkék” expanziójának gátlása mindkét ökotípusnál bekövetkezett, de az AA-ökotípus esetében azonos Cr(VI)-koncentrációnál a gátlás jóval nagyobb mértékűnek bizonyult (37, 50 illetve 55%-os a 25, 50 illetve 100 μM -os kromátkezelés hatására), mint az MA-ökotípusnál (18. ábra). Az utóbbi ökotípus esetében az egyes rametek átlagos felülete 11%, 25% illetve 37%-kal csökkent 25, 50 illetve 100 μM Cr(VI)-kezelés hatására.

A tenyészetek biomasszájának változása

A tenyészetek frisstömege alapján számolt növekedési ráták Cr(VI)-kezelésekkel szembeni érzékenysége a levélfelület RGR-hez hasonló volt. Az AA-ökotípusnál 25 μM Cr(VI) hatására a növekedési ráta 27%-kal, 50 μM Cr(VI)-nál 36%-kal, 100 μM Cr(VI)-nál pedig 45%-kal maradt el a kontroll értékétől (19. ábra).

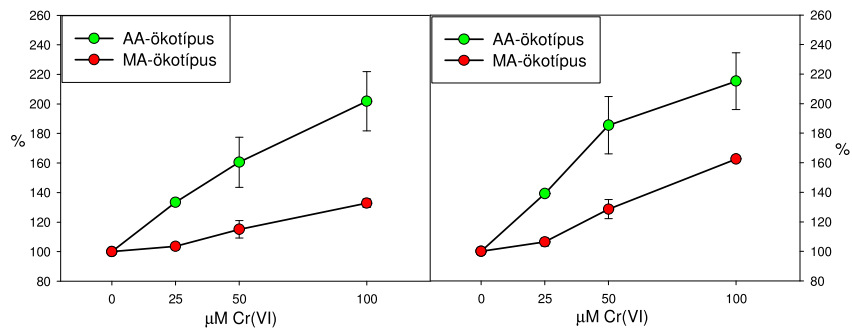


19. ábra Az AA- és MA-ökotípusok tenyészeinek frisstömege alapján számolt növekedési ráták a tesztek 10. napján, a kontroll értékek százalékában (n=4, a két ökotípusnál azonos kromát koncentráció mellett mért gátlások közti különbségek **p<0,01, *** p<0,001 szinten szignifikánsak)

A tenyészetek frisstömegének a változása is jól tükrözte, hogy az MA-ökotípus az AA-ökotípussal összevetve az alacsonyabb Cr(VI)-

koncentrációkkal (25-50 μM) szemben kisebb érzékenységet mutat (19. ábra). 25 μM Cr(VI) hatására az MA-ökotípus növekedési rátája mindössze 9%-kal, 50 μM Cr(VI)-nál 26%-kal csökkent a kontrollhoz képest. 100 μM Cr(VI) 42%-os, az AA-ökotípushoz hasonló mértékű RGR csökkenést okozott a kontrollhoz viszonyítva (19. ábra).

A króm(VI)-koncentráció emelkedésével mindkét vizsgált ökotípusnál megfigyelhető volt a szárazanyag-tartalom növekedése (20. ábra). Az MA-ökotípusnál azonban jóval kisebb mértékű emelkedés volt mérhető, mint az AA-ökotípus tenyészteteiben. Ezt a békalencse-fajoknál, általános stresszválasznak tekinthetjük és a felborult glükózanyagcsere miatt bekövetkező keményítő-felhalmozással magyarázható (Tkalec et al. 1998, Dirilgen 1998, Nichols et al. 2000, Severi 2001). Feltételezhető azonban az is, hogy ezeknél a fajoknál is, mint a *Salvinia minima* esetében megfigyelték (Gitz et al. 2004), a szárazanyag tartalom növekedése Cr(VI) hatására a levelek tömörödését és a sejtfalak vastagodását is jelzi.



20. ábra Az AA- és MA-ökotípusok tenyészteteinek szárazanyag tartalma (balra) és specifikus levéltömege (SLM, jobbra) a tesztek 10. napján, a kontroll értékek százalékában (n=4)

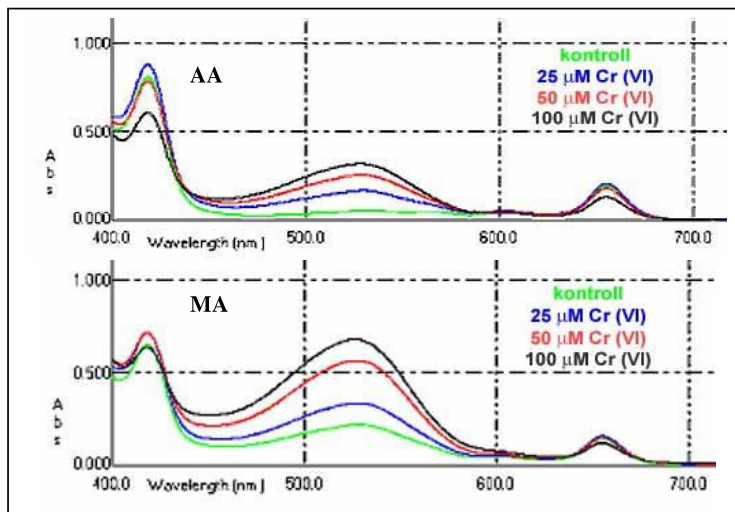
Ezeket az anatómiai változásokat tükrözi a tenyésztetek száraztömege és össz-levélfelülete alapján számolt specifikus levéltömeg (SLM) értéke is (20. ábra). Az SLM az MA-ökotípus kontroll tenyészteteiben magasabb volt, mint az AA-ökotípus kontroll értéke ($128,4 \pm 13,8$ illetve $196,5 \pm 27,0$ $\text{mg}_{\text{SZT}} \text{mm}^{-2}$ az AA- illetve MA-ökotípusnál). Cr(VI)-kezelések hatására emelkedő SLM-értékek voltak mérhetőek, ami a levelek szerkezetének tömörödését tükrözi (Gitz et al. 2004). Az SLM a kromátkoncentráció növekedésével az AA-ökotípusnál a szárazanyag tartalomhoz hasonlóan nagyobb mértékben emelkedett, mint az MA ökotípus esetében. Az MA-ökotípus 25 μM Cr(VI) mellett nevelt tenyészteteinek az SLM értékében nem volt szignifikáns az eltérés a kontrollhoz viszonyítva, de 50 és 100 μM Cr(VI)-koncentrációnál már jelentős ($p < 0,05$ illetve $p < 0,01$) emelkedést figyeltünk meg (20. ábra).

4.2.2. Az antocián-tartalom változása

A *S. polyrrhiza* egyik jellemző tulajdonsága, hogy a levelek abaxiális epidermiszében antocián halmozódik fel. Ez a folyamat optimális nevelési körülmények között is megfigyelhető, de stressz felléptekor erősödik (Tkalec et al. 1998, Kumar és Sharma 1999).

A két ökotípus között a legnagyobb eltérés az antocián-felhalmozás mértékében van (Oláh et al. 2008b), a megkülönböztetésükben is ezt a tulajdonságot vettük alapul (ld. 3.1.1 fejezet). A vizsgálatok során az MA-ökotípus kontroll növényei számottevő mennyiségű antociánt halmoztak fel, ami az abaxiális levélfelszíneken szabad szemmel is jól látható elszíneződésben jelenik meg. Az AA-ökotípus kontroll növényei csak csekély mennyiségben halmoznak fel antociánt, és ez az alsó levélfelszín elszíneződésében nem mutatkozik meg, mert a klorofillok zöld színe elfedi az antociánok színét (4. kép).

Az abaxiális levélfelszín lilás elszíneződését okozó antociánok jelenlétét és a két ökotípus optimális körülmények között nevelt tenyészeteiben a felhalmozásuk eltérését a spektrofotometriás mérések is igazolták (21. ábra).



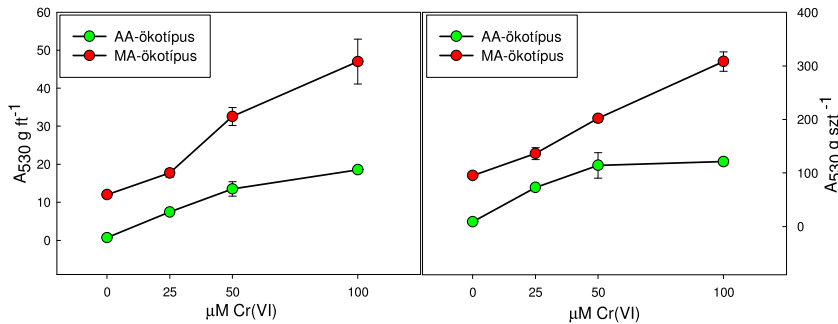
21. ábra Az AA- (felső) illetve MA-ökotípus (alsó) 79:20:1 MeOH:H₂O:HCl kivonatában mért abszorbancia-spektrumai a jellegzetes maximummal 530 nm-en. A kivonáshoz használt növényi frisstömeg: 13-15 mg volt.

Az AA-ökotípus esetében a tesztek 10. napjára a frisstömegegre vonatkoztatott antocián-tartalomban a kontroll tenyészetek elhanyagolható értékéhez ($0,684 \pm 0,271 A_{530} \text{ g}^{-1}$) viszonyítva 25 μM Cr(VI) hatására több

mint tízszeres, 50 μM Cr(VI)-nál mintegy húszszoros növekedés volt mérhető. 100 μM Cr(VI)-nál az emelkedés üteme mérséklődött (22. ábra), és az 50 és 100 μM Cr(VI)-kezelésekkel kiváltott antocián-felhalmozások között a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

A száraztömegre vonatkoztatott antocián-tartalom növekedése mérsékeltebb volt, 8, 13 és 13,5-szeres emelkedés volt mérhető 25, 50 illetve 100 μM Cr(VI) hatására. A frisstömegre vonatkoztatott eredményekhez hasonlóan az 50 és 100 μM Cr(VI)-kezelések hatása közötti különbség nem volt szignifikáns. Az antocián-tartalom friss tömegre vonatkoztatott értékéhez képest kisebb mértékű növekedés a szárazanyag tartalom emelkedésének lehet a következménye.

Az MA-ökotípus kontroll növényeinek a friss tömegre vonatkoztatott átlagos antocián-tartalma a 10. napon $12,00 \pm 1,28 A_{530} \text{ g}_{\text{ft}}^{-1}$ volt (22. ábra). Az AA-ökotípusnál ehhez hasonló antocián-felhalmozást 50 μM Cr(VI) indukált. Az MA-ökotípus tenyészteteiben 25 μM Cr(VI)-kezelés hatására az antocián-felhalmozás erősödött (22. ábra), de a kontroll magas értékei miatt az emelkedés mértéke alacsonyabb volt, mint az AA-ökotípus esetében. A tesztek 10. napján 25 μM Cr(VI)-nál 150%-os, 50 μM Cr(VI)-nál 270%-os, 100 μM Cr(VI)-nál pedig 390%-os növekedés volt mérhető a kontroll értékéhez képest. Az AA-ökotípushoz hasonlóan az 50 és 100 μM -os Cr(VI)-kezelések között a különbségek gyenge szignifikanciát ($p < 0,1$) mutattak.

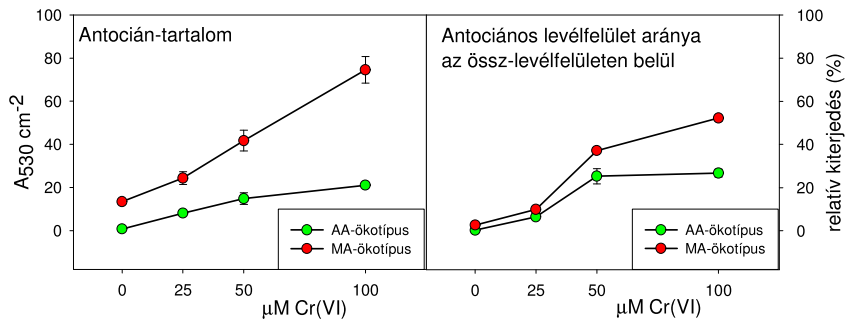


22. ábra Az AA- és MA-ökotípusok tenyészteteinek friss- (balra) és száraztömegre vonatkoztatott antocián-tartalma (jobbra) a tesztek 10. napján ($n=4$)

Amennyiben az antocián-tartalmat szárazanyagra ($A_{530} \text{ sztt}^{-1}$) vonatkoztatjuk, az MA-ökotípus esetében a Cr(VI)-koncentráció növekedésével az AA-ökotípus tenyészteteinél megfigyelthez hasonlóan a frisstömegre vonatkoztatott értékekhez képest kisebb emelkedés mutatható ki (22. ábra). A tesztek 10. napjára az antocián-tartalom 25 μM Cr(VI)-nál a kontroll értékének ($95 A_{530} \text{ g}^{-1} \text{ sztt}$) 140%-ára, 50 μM Cr(VI)-nál 240%-ára, 100 μM Cr(VI)-nál 300%-ára emelkedett.

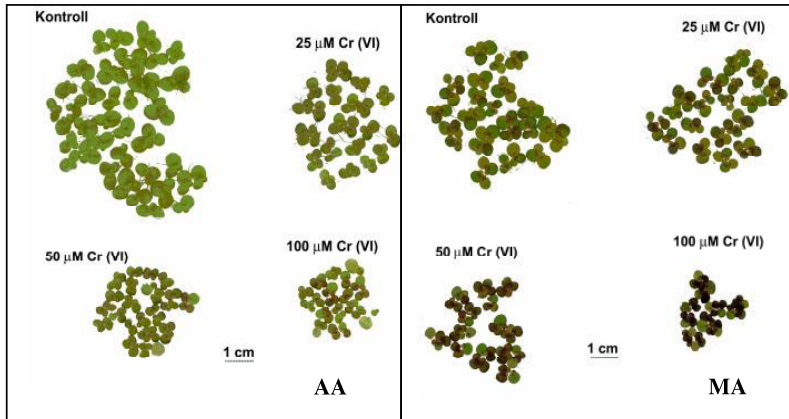
A növények levélfelületre vonatkoztatott antocián-tartalma, a frisstömegre vonatkoztatott értékek változásához hasonlóan, emelkedést mutatott a Cr(VI)-koncentráció növekedésével. Az AA-ökotípus kontroll tenyészetében mért $0,768 A_{530} \text{ mm}^{-2}$ értékkel összevetve, $25 \mu\text{M}$ Cr(VI)-nál tízszeres, $50 \mu\text{M}$ Cr(VI)-nál tizenkilencszeres és $100 \mu\text{M}$ Cr(VI)-nál huszonhétyszeres emelkedés volt mérhető a tesztek 10. napjára (23. ábra). A friss- és száraztömegre vonatkoztatott adatokhoz hasonlóan 50 és $100 \mu\text{M}$ Cr(VI) hatása között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést.

Az MA-ökotípusnál a kontroll növények egységnyi levélfelületre vonatkoztatott antocián-tartalmához képest ($13,3 A_{530} \text{ mm}^{-2}$) $25 \mu\text{M}$ Cr(VI) kétszeres, $50 \mu\text{M}$ Cr(VI) háromszoros, $100 \mu\text{M}$ Cr(VI) közel hatszoros antocián-tartalom emelkedést váltott ki (23. ábra).



23. ábra A króm(VI) hatása az AA- és MA-ökotípusok levélfelületre vonatkoztatott antocián-tartalmára (balra), illetve az antociános levélfelületek relatív, százalékos kiterjedésére (jobbra) a tesztek 10. napján (n=4)

A levélfelszín-elemzések során, a spektrofotometriás mérésekhez hasonlóan a kromátkoncentráció növelésével mindkét ökotípusnál az antocián-tartalom nagymértékű emelkedése állapítható meg (23. ábra, 4. kép). A felhalmozódás az antociános felületváltozások alapján minden alkalmazott Cr(VI)-koncentrációnál kimutatható volt, azonban az AA-ökotípusnál az 50 és $100 \mu\text{M}$ -os Cr(VI)-kezelések közötti különbség nem volt szignifikáns (23. ábra).



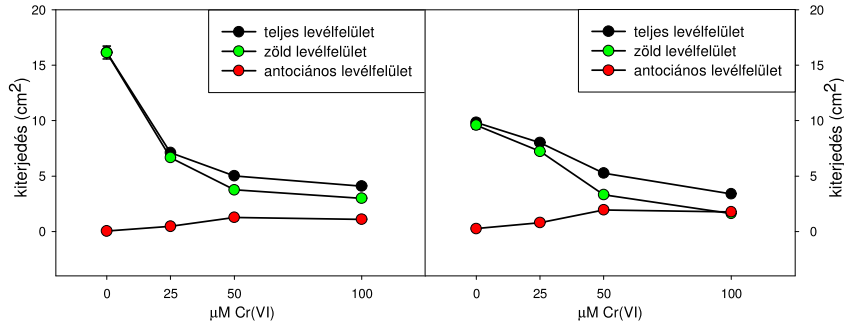
4. kép A levélfelszín-elemzéshez használt képek, a zöld, illetve lila, „antociános” levélfelületekkel a tesztek 10. napján az AA- (balra) és MA-(jobbra) ökotípus tenyészteteinél

Az AA-ökotípus levélfelületének 25 μM Cr(VI) hatására átlagosan a 6,5%-a, 50 μM Cr(VI) hatására pedig 25%-a vált lila színűvé. A használt felületelemzési módszerrel az 50 és 100 μM Cr(VI)-tal kezelt tenyészetek között további emelkedést mértünk a zöld és lila „levélfelszínnek” relatív megoszlásában, a változás azonban, nem volt szignifikáns (23. ábra). Ugyanakkor az MA-ökotípusnál a tesztek 10. napjára a Cr(VI)-koncentráció növekedésével a lila levélfelszínnek részaránya tovább emelkedett. Az MA kontroll tenyészet 2,5%-os antociános relatív levélterületével szemben a Cr(VI) hatására a lila levélfelszínnek aránya a következők szerint emelkedett: 10% 25 μM Cr(VI) alkalmazásakor, 37% 50 μM Cr(VI) jelenétében és 52% 100 μM Cr(VI) mellett (23. ábra).

Az antociános, lila levélfelületek teljes levélfelülethez viszonyított arányának a változása nagy hasonlóságot mutatott a frisstömegegre vonatkoztatott antocián-tartalom változásával. A két vizsgálati módszer érzékenysége csupán a 25 és 50 μM Cr(VI) között mért antocián-tartalomnál mutatott nagyobb különbséget, a levélfelület elemzés javára. Ennek oka, hogy ebben a koncentráció tartományban az antocián-felhalmozás nem a már „antociános” sejtekben fokozódik, hanem újabb sejtek elszíneződése -az antociános levélfelületek expanziója- következik be.

Az antociános levélfelületek abszolút, mm²-ben kifejezett területe mindkét ökotípusnál 50 μM Cr(VI)-ig emelkedett, 100 μM Cr(VI) hatására azonban csak az MA-ökotípus tenyészteteiben történt további, szignifikáns változás (24. ábra). Az antociános levélfelületnek a teljes levélfelülethez viszonyított százalékos részaránya az MA-ökotípusnál 50 és 100 μM Cr(VI)-koncentrációk között is meredeken emelkedett, ellentétben az AA-

ökotípusnál mért nem szignifikáns változással (23. ábra). Az antociános levélfelületek százalékos arányának emelkedése döntően az emelkedő Cr(VI)-koncentrációk okozta össz-levélfelület csökkenésnek tulajdonítható (24. ábra).



24. ábra Az antociános és nem antociános levélfelületek teljes levélfelülethez viszonyított kiterjedése a tesztek 10. napján az AA- (balra) illetve MA-ökotípus (jobbra) kontroll és króm(VI)-kezelt tenyészteteiben (n=4)

A növekedési paraméterek és az antocián-tartalom vizsgálati eredmények összevetése alapján levonható az a következtetés, hogy az MA-ökotípus nagymértékű antocián-felhalmozása a tenyésztetei lassabb fejlődését okozza, hiszen az asszimilált szén egy jelentős része nem a növények növekedési ütemének fenntartását szolgálja, hanem az antociánok szénvázába épül be (Chalker-Scott 1999, Kumar és Sharma 1999). A króm(VI)-kezelt tenyésztetekben leginkább az újonnan képződött leveleken figyelhető meg az antocián akkumulációja. Az MA-ökotípus Cr(VI)-kezelt tenyészteteiben az új rametek képződési üteme és átlagos levélfelülete elmaradt a kontroll növényekétől, a specifikus levéltömegük azonban meghaladta azokét. Emiatt a magasabb Cr(VI) koncentrációk hatására nagyobb felületre vonatkoztatott antocián-tartalom mérhető, mint a frisstömegre vonatkoztatott érték.

A kapott eredmények alapján a *S. polyrrhiza* antocián-felhalmozása alkalmas a növényeket érő nehézfém-stressz jellemzésére. A növények metanolos kivonatának spektrofotometriás elemzése - a viszonyítási alaptól függetlenül - a Cr(VI)-koncentráció növekedésével jelentős antocián-tartalom emelkedést jelzett minkét ökotípusnál. A levélfelszínek képelemzése szintén alkalmasnak bizonyult a növények stresszállapotának jellemzésére.

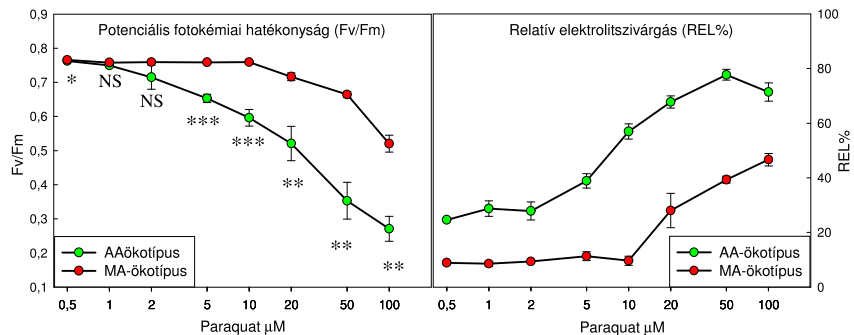
Az antociánok mennyiségi mérésén alapuló módszereknek vannak korlátai (csak gyengébb stresszhatásoknál arányos más, pl a növekedési paraméterek változásával, Krupa et al. 1996). Ennek ellenére a levélfelszín-elemzés módszerének továbbfejlesztésével (pl. antociánkoncentrációt jellemző színskála kidolgozása) egy *in vivo* egyszerűen alkalmazható, nem destruktív, olcsó mérőrendszer állítható össze (Oláh et al. 2008b, Oláh et al.

2008c, Oláh et al. 2009a, Oláh et al. 2009b). Ilyen mérőrendszerrel jól jellemezhető az antociánokat nagy mennyiségben felhalmozó vízinövények (pl. *Azolla*-fajok – Zimmerman 1985, *Spirodela* - Tkalec et al. 1998, Oláh et al. 2008b, Oláh et al. 2009b, *Hydrilla verticillata* (L.f) - Doong et al. 1993, *Potamogeton gramineus* (L.)– Spencer és Ksander 1990) ún. „stressz-előélete”.

4.2.3. A két ökotípus oxidatív stressz-toleranciájának vizsgálata

Az antociánok oxidatív stressz elleni védekezésben játszott szerepének alátámasztására a Cr(VI) kezelésekk mellett vizsgáltuk a két *S. polyrrhiza* ökotípus paraquat-toleranciáját. A nem szelektív bipiridillium herbicidek közé tartozó paraquat (Pq) a PSI redukáló oldaláról eltérítve az elektronokat, reaktív Pq-kationgyököket képez, így fény jelenlétében oxidatív stresszt eredményez (Visnovitz et al. 2008). Mivel a fotoszintézis alapvető folyamatát támadja, igen kevés Pq-rezisztens növény-ökotípus ismert, így a Pq-kezelés alkalmas a különböző növényfajok, illetve fajon belüli változatok oxidatív stresszt tűró képességének az összehasonlítására (Kós et al. 2008, Prado et al. 2009).

Az alkalmazott paraquat koncentráció tartományban (0-100 μM) fotooxidatív károsodás mindkét ökotípus esetében bekövetkezett, azonban a két ökotípus esetében a Cr(VI)-kezelésekhez hasonlóan eltérés tapasztalható az oxidatív stresszel szembeni érzékenységben (25. ábra).



25. ábra Az AA- és MA-ökotípusok tenyészeinek potenciális fotokémiai hatékonysága (Fv/Fm, balra) illetve relatív elektrolitszivárgása (REL%, jobbra) háromórás, 50 μM $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson végzett Paraquat-kezelést követően (n=4, a két ökotípusnál azonos Pq-koncentráció mellett mért gátlások közti különbségek *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 szinten szignifikánsak)

A potenciális fotokémiai hatékonyság (Fv/Fm) szignifikáns csökkenése az AA-ökotípus testnövényeiben ugyan már 1 μM Pq-nál bekövetkezik, erős

visszaesés azonban csak 5 μM Pq-nál mérhető. 100 μM Pq az Fv/Fm értékét 0,2 közeli értékre csökkenti (25. ábra), ami a fotoszintézis gyakorlatilag teljes leállítását jelenti. Az MA-ökotípusnál is szignifikáns csökkenést okozott már 1 μM Pq-kezelés is, az Fv/Fm nagymértékű gátlása azonban csak 20 μM Pq-kezeléstől figyelhető meg, és még 100 μM Pq-koncentrációnál is 0,5 fölötti értékek mérhetők (25. ábra). A két ökotípus Fv/Fm-gátlása közötti szignifikáns különbséget 5 mM Pq-koncentrációtól tudunk mérni.

A Pq hatására kifejlődő membránkárosodással arányosnak tekintett relatív elektrolitszivárgás (REL%) értékek (Kanoun-Boulé et al. 2009) a két *S. polyrrhiza* ökotípusnál az Fv/Fm-hez hasonló mintázatot mutatnak. Az AA-ökotípusnál az elektrolitszivárgás mértéke 5 μM Pq-tól folyamatosan emelkedik (25. ábra). 100 μM Pq-nál a REL% kismértékű visszaesése valószínűsíthetően a membránok olyan mértékű károsodását jelzi, hogy a növényi sejtek elektrolittartalmának egy része már a Pq-kezelés közben, közvetlenül a kezelőoldatba mosódik, így az inkubációs közegben a vezetőképességet nem növeli (ld. „Anyag és módszer” c. fejezet). Az MA-ökotípusnál a REL%-értékek emelkedése a potenciális fotokémiai hatékonysághoz hasonlóan 20 μM Pq-nál következik be, és az alkalmazott koncentráció tartományon belül végig az AA-ökotípusnál tapasztalt értékek alatt marad (25. ábra).

Az eredmények alapján megállapítható, hogy kromátkezelés alatt az antociánok felhalmozásának indukciója nem a metabolizmus Kumar és Sharma (1999) által leírt felborulásának (i.e. tápelemhiány, C/N arány változása) a következménye. A két ökotípus antocián-felhalmozó képességének, illetve kromáttal és paraquattal szembeni toleranciájának különbsége alapján a *S. polyrrhiza* esetében az antocián-felhalmozás legvalószínűbb célja az oxidatív stressz kivédése. Ezt a feltételezést támasztja alá a direkt fotooxidatív károsodás (Pq-kezelések) jobb kivédése az MA-ökotípusban, illetve az alacsonyabb koncentrációjú kromátkezelésekkel szembeni nagyobb tolerancia is.

Az antociánoknak tulajdonított, az Irodalmi előzmények c. fejezetben bemutatott többi funkciót (Chalker-Scott 1999, Close és Beadle 2003, Gould 2004, Manetas 2006) vizsgálva a következők állapíthatók meg:

- a. Az antociánok szintézise szénforrásokat von el a biomassza termelés és a reprodukció rovására. Ez mutatkozik meg a másik két vizsgált fajhoz viszonyított lassúbb növekedésben, ami a kompetíciós viszonyokat tekintve előnytelen sajátosság.
- b. A fényvédelem (UV-szűrés, asszimiláló szövetek, kloroplasztiszok árnyékolása) szempontjából az antocián-felhalmozás előnytelen helyen, a növények abaxiális epidermiszének közelében zajlik. A vízfelszíni növényiszőnyegben a jó fényabszorpciós képességű

vegyületek felhalmozása közvetve azonban kompetíciós előnyt jelentő tulajdonság lehet, mivel a mélyebben elhelyezkedő növények (makrofiták, algák) hatékonyabb leárnyékolását és ezzel növekedésük visszaszorítását szolgálhatja. A 4.1.1 fejezetben ismertetett feltételezést (Dickinson és Miller 1998 illetve Lemon et al. 2001), mely szerint a *S. polyrrhiza* a legtöbb békalencse-fajhoz képest nagyobb testméretével és lassabb terjedésével k-stratégistának tekinthető, alátámaszthatja az antociánok nagymértékű felhalmozása, ami természetes körülmények között előnyt biztosít a fajnak.

- c. Az ozmotikus stressz elleni védelemben a más fenolvegysületekhez képest viszonylag alacsony koncentrációban felhalmozódó antociánok nem jelenthetnek hatékony többletvédelmet. Ráadásul a szárazföldi növényekkel összevetve ezeknek a szabadon úszó vízínövényeknek az esetében a víztakarékosság nem elsődleges szempont.
- d. A növényeket fogyasztó állatok elriasztásához az abaxiális epidermiszen az antocián-felhalmozás színhelye a fényvédő funkcióhoz hasonlóan előnytelen.
- e. A *S. polyrrhiza* esetében az antocián felhalmozásnak a stressz növekedésével fellépő erősödése alapján arra következtethetünk, hogy az antociánok az oxidatív stressz kivédésében töltenek be fontos szerepet (Oláh et al. 2008c, Oláh et al. 2009a).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink során axenikus tenyészetekben hasonlítottuk össze a *L. gibba*, *L. minor*, és *S. polyrrhiza* békalencse-fajok Cr(VI)-tal szembeni toleranciáját.

A célkitűzések a következők voltak:

- Három, Magyarország vizeiben általánosan elterjedt békalencse-faj, a *Lemna gibba* L., *L. minor* L., és a *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden akut és krónikus kromátkezeléssel szembeni toleranciájának az összehasonlítása, fiziológiai illetve növekedési paraméterek alapján.
- A békalencse-tesztekben a kromát toxicitásának jellemzésére a fiziológiai folyamatok érzékenységének az összehasonlítása.
- A *S. polyrrhiza* esetében az antocián-felhalmozás ökotípusok szerinti eltéréseinek tanulmányozása.
- A *S. polyrrhiza* antocián-felhalmozó képességének kromát-, illetve más stresszhatások esetén biomarkerként való alkalmazhatóságának a vizsgálata.
- A *S. polyrrhiza* antocián-felhalmozásának laboratóriumi vizsgálatára egy rutinszerűen használható, egyszerű módszer kidolgozása.

5.1. A három vizsgált békalencse-faj kromátérzékenységének összehasonlítása

A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált békalencse-fajok króm(VI)-toleranciája eltérő volt.

A hosszú-távú, tíznapos tesztek során, a növekedési rátákban tapasztalt gátlások alapján az érzékenység sorrendje 100 μ M Cr(VI) hatására: *L. minor* > *L. gibba* \approx *S. polyrrhiza*.

A rövid-távú tesztekben mért klorofill fluoreszcencia paraméterek alapján a vizsgált békalencse-fajok alábbi kromát-érzékenységi sorrendjét tapasztaltuk: *L. minor* > *S. polyrrhiza* > *L. gibba*.

A fényadaptált növények klorofill fluoreszcencia paraméterei alapján az egyensúlyi („steady state”) állapotú fotoszintézis eléréséhez a *L. gibba* és *L. minor* tenyészeteknek 5 perc megvilágítás elegendőnek bizonyult, míg a *S. polyrrhiza* tenyészteteiben 10 perces aktiváló megvilágítás volt szükséges.

A fotokémiai fluoreszcencia kioltás (qP) az aktiváló megvilágítási időszak végére mindhárom vizsgált faj tenyészteteiben az alkalmazott króm(VI) koncentrációval arányosan csökkent.

A nem-fotokémiai kioltás részfolyamatai az alkalmazott króm(VI) koncentrációtól függően az egyes fajok esetében eltérő mintázatot mutattak.

A károsodott fotokémiai rendszerek mennyiségével arányosnak tekintett ún. nem szabályozott nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás -Y(NO)- a *L. minor* illetve *S. polyrrhiza* tesztnövényeiben a króm(VI) koncentrációk növekedésével emelkedett a fotokémiai hatékonyság ($\Delta F/F_m'$) rovására, míg a *L. gibba* esetében inkább a szabályozott nem-fotokémiai kioltás -a Y(NPQ)- részaránya növekedett, ami magyarázatot ad az ennél a fajnál tapasztalt nagyobb kromát-toleranciára.

A gyors ETR fényválasz görbékből származtatott maximális fotonhasznosítási együttható (α), illetve az ETR_{max} értékek megerősítették a *S. polyrrhiza* tesztnövények fotoszintézisének a másik két békalencse-fajhoz képest lassabb alkalmazkodását az aktiváló megvilágításhoz, illetve a *L. minor*nak a másik két fajhoz viszonyított nagyobb kromátérzékenységét.

5.2. Az ökotoxikológiai tesztekben általunk vizsgált növekedési és fiziológiai jellemzők érzékenységének az összehasonlítása

A krónikus, tíznapos kromátkezelések hatására mindhárom békalencse-faj tenyészeteiben a növekedési paraméterek visszaesését tapasztaltuk.

A teszt-tenyészetek kolóniaszáma nem tükrözte megfelelően a króm(VI) gátló hatását, a kolóniánkénti átlagos rametszám azonban megváltozott a kromátkezelések hatására. A *L. gibba* és *L. minor* tenyészeteiben az oxidatív stressz hatására a kolóniák feldarabolódása, azaz a rametek szétválása volt megfigyelhető a tesztek 10. napjára. A *S. polyrrhiza* tenyészeteiben ezzel ellentétes folyamat zajlott le, melynek eredményeként az egy kolóniára jutó átlagos rametszám megemelkedett.

A vizsgált növekedési paraméterek közül az össz-rametszámok viszonylag kis érzékenységet mutattak a kromátkezelésekkel szemben, míg a frisstömeg- és száraztömeg növekedési ráták nagyobb növekedésgátlást jeleztek. A biomassza-gyarapodásnak a rametszámhoz viszonyított erősebb gátlása egyben a rametek átlagos méretének csökkenését is jelezte.

A kromátkezelések hatásai már 48 óra alatt kimutathatóak voltak a vizsgált fiziológiai jellemzők segítségével, szemben a hosszabb időt igénylő, a kezelést követően csak 3-4 nappal kezdődő növekedésgátlással szemben. 48 órás tesztekben a sötétadaptált növényekben mért, a maximális- és alapfluoreszcencia arányát kifejező F_m/F_o hányados nagyobb érzékenységgel jelezte a króm(VI) gátló hatását, mint a potenciális fotokémiai hatékonysággal arányos F_v/F_m hányados.

Az eredményeink alapján a fényadaptált növényekben mért, aktuális fotokémiai hatékonysággal arányos $\Delta F/F_m'$ nagyobb érzékenységgel jelezte a króm(VI)-stresszt, mint a sötétadaptált növényekben mért és hasonló módon számított F_v/F_m . A $\Delta F/F_m'$ és a teljes fotoszintézissel arányosnak tekintett relatív fluoreszcencia csökkenés (RFD) a *L. gibba* és *S. polyrrhiza*

tesztnövényekben egymástól függetlenül változott, ami a két paraméter eltérő króm(VI)-érzékenységet jelezte ugyanazon növényekben.

Az ETR fényválasz görbék változása alapján a króm(VI)-kezelések hatására mindhárom faj tenyészeteiben csökkent az elektrontranszport indukálhatósága.

A króm(VI) 48 óra alatt mindhárom békalencse fajban csökkentette a fotoszintetikus pigment tartalmat, de az egyes fajok között, illetve a kromát-koncentrációtól függően a rövid kezelési idő miatt nem jelentkeztek eltérések, illetve azok kisebbek voltak, mint a klorofill fluoreszcencia paraméterek esetében. Cr(VI) hatására a klorofilok közül a kl-*a* tartalom nagyobb mértékben csökkent a tesztnövényekben, mint a kl-*b* mennyisége, ami elsősorban a PSII reakciócentrumok sérülését valószínűsíti. Ez magyarázza a nem szabályozott nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás részarányának emelkedését is. A tesztnövényekben a karotinoid-tartalom csökkenése a klorofilokénál kisebb volt, ami a karotinoidok kromáttal szembeni kisebb érzékenységét, illetve a fotoszintetikus apparátusoknak az oxidatív stressz kivédése miatt megnövekedett karotinoid-igényét jelzi. A sérült reakciócentrumok számának emelkedésével az egy működőképes reakciócentrumra jutó átlagos antennaméret is növekszik. A felesleges gerjesztési energia elvezetését, illetve a fotooxidatív stressz elleni védekezést jelzi a nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltással arányos qN illetve Y(NPQ) paramétereknek a kromátkezelések hatására mért magasabb értéke.

5.3. Az eltérő antocián-felhalmozó képességű *S. polyrrhiza* ökotípusok vizsgálata és Cr(VI) érzékenysége

A *S. polyrrhiza* általunk vizsgált két ökotípusa között különbséget tapasztaltunk az antocián-felhalmozásban. Az egyik ökotípust antociánt nagyobb mértékben akumuláló MA-ökotípusként írtuk le, amelynél mind a spektrofotometriás mérésekkel, mind az „antociános” levélfelület meghatározások során nagyobb antocián-tartalmat mutattunk ki. Ugyanezen módszerekkel nyert eredmények alapján a másik ökotípust az antociánt alacsonyabb koncentrációban akumuláló AA-ökotípusként jellemeztük. Az „AA” illetve „MA” ökotípus azonos nevelési feltételek mellett eltérő sebességű növekedést mutatott. Az MA-ökotípus lassabb növekedését az antociánok termelésére fordított nagyobb szénforrás felhasználás és többletenergia magyarázza, ami „természetes” körülmények között kompetíciós hátrányt jelenthet e változat számára.

Kimutattuk, hogy az antociánoknak a kromát-stressz hatására erősödik a felhalmozása mindkét ökotípus esetében. A két, eltérő antocián-felhalmozású ökotípus kromátkezelései során kapott eredményeink az antociánoknak az antioxidáns védelemben betöltött szerepét valószínűsítik.

Alacsonyabb (25-50 μM) króm(VI)-koncentrációk mellett, a több antocián felhalmozó (MA) ökotípus tenyészetei a hatékonyabb védelemnek köszönhetően kisebb növekedési gátlást mutattak. A 100 μM Cr(VI)-koncentráció már olyan magasnak bizonyult, hogy a két ökotípus érzékenysége közel megegyezett. Az eredmények arra is rámutatnak, hogy az antociánok felhalmozására fordított többlet szénforrás és energia a vegyületek védő szerepe miatt megtérül, és bizonyos termőhelyi feltételek (pl. nehézfém- vagy herbicid terhelések) mellett a faj számára előnyt biztosíthat. A *S. polyrrhiza* antocián felhalmozása, és annak Cr(VI) hatására történő felerősödése magyarázatot adhat arra, hogy a faj növekedési jellemzői és fiziológiai folyamatai a többi két fajhoz képest a rövid és hosszú-távú tesztekben eltérő érzékenységet mutattak.

5.4. A *S. polyrrhiza* antocián-felhalmozásának, mint potenciális biomarkernek az alkalmazhatósága

A spektrofotometriás mérések az alkalmazott Cr(VI)-koncentrációval arányosan emelkedő antocián-tartalmat mutattak ki mindkét *S. polyrrhiza* ökotípus teszt-tenyészeteiben a hosszú-távú tesztek 10. napján. Mivel a saját eredményeken kívül a *S. polyrrhiza* növényekben az antocián-felhalmozást más stressztényezők felléptekor is megfigyelték és leírták, vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy alkalmas lehet-e a stressz mértékét jellemző, nem specifikus biomarkernek.

A vizsgálataink során kidolgoztunk egy digitális képfeldolgozási módszert a *S. polyrrhiza* tenyészetekben az „antociános” levélfelületek *in vivo* mérésére. A digitalizált abaxiális levélfelület értékelése különösen a frisstömegre vonatkoztatott spektrofotometriás antocián-tartalommal adott jól egyező eredményeket. A módszer továbbfejlesztésével, a korlátainak a pontos megismerésével egy „nem destruktív”, *in vivo*, sorozatmérésekre alkalmas és olcsó mérőrendszer állítható össze. A módszer alkalmazásával a *S. polyrrhizát* felhasználó ökotoxikológiai tesztekben a nehézfémek és más stresszorok hatásai a növekedési paramétereknél nagyobb érzékenységgel mutathatók ki.

5.5. Az eredmények gyakorlati szempontból való alkalmazhatósága

A *L. gibba*, *L. minor* és *S. polyrrhiza* axenikus tenyészeteivel végzett vizsgálataink eredményei alapján a békalencse-fajok króm(VI)-kezelésekkel szembeni érzékenysége eltérőnek bizonyult azonos tesztkörülmények között. Mivel az ökotoxikológiai és fiziológiai kutatásokban elterjedten alkalmazott

modellszervezetekről van szó, az eredményeink rámutatnak arra, hogy a rutintesztek tervezésekor szükséges az egyes fajok illetve ökotípusok eltérő stressz-toleranciájának a figyelembevétele.

Az eredményeink alapján a klorofill fluoreszcencia indukció módszer alkalmas a békalencse-tesztekben a szennyező anyagok toxikus hatásainak a megállapítására. A klorofill fluoreszcencia indukcióban bekövetkező változások a növekedési paraméterekhez viszonyítva hamarabb jelzik a növényeket érő stressz-hatásokat. Ez a rövidebb vizsgálati idő különösen a gyors beavatkozást igénylő (pl. havária-jellegű szennyezések) esetekben járhat jelentős előnyökkel.

A növények fényakklimált állapotában mérhető klorofill fluoreszcencia paraméterek alkalmazásával *in vivo* jellemezhetők a fotoszintézis egyes részfolyamatai. Ez lehetővé teszi az adott szennyező anyagok hatásainak részletes, nem destruktív vizsgálatát, illetve a kapott eredmények alapján a későbbi specifikus vizsgálatok tervezését, és az új biomarkerek megtalálását.

A *S. polyrrhiza* vizsgálata során kapott eredmények alátámasztják azt a feltételezést, hogy az antociánok nem-enzimatis antioxiánként kisegítő szerepet töltenek be az oxidatív stressz elleni védelemben. Az antociánoknak a stressz hatására felerősödő akkumulációja alkalmas és ajánlható lehet a *S. polyrrhiza*val végzett tesztekben nem specifikus biomarkerként való felhasználásra. A békalencse-tesztekben hagyományosan használt növekedési paraméterekhez képest a növényi kivonatok antocián-tartalmának spektrofotometriás vizsgálata illetve az antociános abaxiális levélfelszínének mérése a gyengébb stresszhatásokat érzékenyebben jelzi.

6. SUMMARY

6.1. Introduction and aims of study

Since chemicals released by human activities have considerable risk on ecosystems environmental protection research pays marked attention to this field. Being widely used and strongly toxic elements heavy metals constitute a particularly harmful group of contaminants.

Chromium due to its strong cytotoxicity and because of its large amounts being released into biogeochemical cycles is especially in the focus of interest. Oxidation form of Cr varies between 0 and +6 and it could be readily changed depending on redox circumstances. Under normal conditions only Cr(III) and (VI) forms are stable. Hexavalent chromium - the most toxic Cr-form - usually exists as chromate (CrO_4^{2-}) or dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) ion. Following the uptake of chromate ion which is similar to that of other chemically homologous ions destroying effects take place within short time period. Likewise other heavy metals Cr(VI) triggers oxidative burst and causes several damages in functioning of plants by alterations in biological membranes and by consequent disorders which triggers decrease in pigment content and photosynthetic capacity. Specific chromate tolerance mechanisms have not been revealed yet. Defence against Cr(VI) induced stress mainly contributed to enzymatic and non-enzymatic antioxidants.

Duckweed species (Araceae) are free-floating small plants which are widely spread in natural waters. Duckweeds can be grown axenically very easily in suitable medium which made them widely used test-organisms in scanning the potential effects of contaminants to plants. Duckweed test methods use various growth parameters or physiological and biochemical changes to estimate possible toxic effect of contaminants. Although these methods offer a rapid way of knowledge about general toxicity of chemicals, biomarkers used in these tests may respond differently and show differences of sensitivity in the case of various chemicals.

A large variety of duckweed test methods have evolved during the past few decades resulting in hardly comparable data. However, comparative studies on the sensitivity of various duckweed species to toxicants are still more or less lacking.

In Hungary the most widely distributed duckweed species are *Lemna gibba* L., *Lemna minor* L. and *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. Among them *S. polyrrhiza* accumulates considerable amount of anthocyanins on its abaxial frond surface. This pigment accumulation takes place even under natural conditions and increases to multifold levels due to various environmental constraints. Despite the frequent appearance of anthocyanins in plants their actual physiological role is still unclear. This pigment group

may have multifold role, e.g. photoprotective, antioxidant and osmoregulative functions but pros and contras make hard to definitely answer this question. Elevation of their concentration in certain plant tissues under stress suggests the probability of their participation in the antioxidant defence.

In our study we compared the sensitivity of *Lemna gibba*, *Lemna minor* and *Spirodela polyrrhiza* grown in axenic cultures against hexavalent chromium and screened for physiological properties which could potentially influence their tolerance against chromate stress.

The objectives of our research were as follows:

- Comparing the sensitivity of three widely distributed duckweed species in Hungary namely *Lemna gibba* L., *L. minor* L., and *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden against chromate treatments in axenic cultures by means of growth and physiological parameters.
- Comparing the sensitivity of studied parameters against chromate treatments.
- Investigating the physiological responses of two ecotypes of *S. polyrrhiza* differing in their anthocyanin accumulating capacity to Cr(VI).
- Screening for possible functions of anthocyanins in *S. polyrrhiza*
- Testing the applicability of anthocyanin content as potential biomarker of environmental stresses in *S. polyrrhiza*.

6.2. Materials and Methods

Axenic stock cultures of *Lemna gibba* L., *Lemna minor* L., and two *Spirodela polyrrhiza* L. (Schleiden) ecotypes were maintained in ½ strength Hutner's medium (pH 6.3) under controlled conditions (PFD=100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 16/8h photoperiod, 25/18°C day/night temperature). The two ecotypes of *S. polyrrhiza* differed in their anthocyanin accumulating capacity.

6.2.1. Conditions of long-term chromate exposures

Preliminary 10ds long growth tests were carried out in order to previously establish the growth inhibition effects of 100 μM Cr(VI) concentration to the tested duckweed species. Screening for potential functions of anthocyanins in *S. polyrrhiza* 10ds growth tests were also performed with 0, 25, 50 and 100 μM Cr(VI) concentrations. 9-12 healthy fronds as initial biomass were transferred into 100 cm^3 Erlenmeyer flasks containing 50 cm^3 of ½ strength Hutner-medium. Cr(VI) was applied at the start of tests using $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ stock

solution. Treatments with every concentration were conducted in 3-4x replications under static conditions. Other culturing conditions correspond to the maintenance of stock cultures.

The calculated growth parameters as test endpoints were as follows:

Number of colonies and number of fronds: visible units were counted daily.

Fresh and dry weights: previously to final biomass measurements plant material was centrifuged by 3000 rpm for 5 min to remove excess water. Fresh weights and dry weights (24 h, 85 °C) were measured with 0,0001g accuracy.

Total frond area: Test cultures were scanned using a flatbed scanner (600 dpi). Digital images of plants were used for calculation of frond area by means of Adobe Photoshop 7.0.

Relative growth rates of cultures were calculated by the equation:

RGR = $(\ln x_t - \ln x_0)/t$ (where: x_t is the final biomass, x_0 is the initial biomass and t is the duration of the test)

Inhibition of growth was calculated by the equation:

$$I\% = [(RGR_{\text{control}} - RGR_{\text{treated}}) / RGR_{\text{control}}] * 100$$

Other methods used in study of two *S. polyrrhiza* ecotypes

Anthocyanic abaxial surface area of plants was also analyzed by same way as leaf area measurement distinguishing the red ('anthocyanic') and green ('non anthocyanic') leaflet segments.

Anthocyanin content of plants was also determined spectrophotometrically in MEOH:dH₂O:HCl (79:20:1 v/v/v) extractions.

Anthocyanin content was calculated by the equation:

$$C_{\text{ant}} = \{(A_{530} - A_{750}) - [0,25 * (A_{657} - A_{750})]\} (\text{biomass})^{-1}$$

Where biomass was unit fresh or dry weight or frond area.

Paraquat-treatments

In order to compare the sensitivity of *S. polyrrhiza* ecotypes against oxidative damage, test plants were treated with 4 cm³ 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 and 100 μM Paraquat (Pq) for 3h under PFD 50 μmol m⁻² s⁻¹ at 20 °C. Subsequently potential photochemical activity (Fv/Fm see below) was determined and relative electrolyte leakage (REL%) of treated plants was measured.

6.2.2. Conditions of short-term chromate exposures

Short-term chromate exposures were performed in 48h long tests under 100 μmol m⁻² s⁻¹ continuous white illumination. 3-5 healthy colonies of stock cultures consisting of three or four fronds were transferred into 100 cm³

Erlenmeyer flasks containing 50 cm³ of growth medium. Cr(VI) was applied at the start of tests in final concentrations of 0, 50, 100 and 200 µM using K₂Cr₂O₇ stock solution. Treatments with every Cr(VI) concentration were performed in four replications under static conditions. Other culturing conditions correspond to the maintenance of stock cultures.

Effects of Cr(VI) were monitored by different ways at the 48th hour of tests:

Chlorophyll fluorescence parameters were measured with PAM 2000 chlorophyll fluorometer (WALZ GmbH, Germany). Potential photochemical efficiency (Fv/Fm and Fm/Fo measured after 20 min dark adaptation), actual photochemical efficiency (ΔF/Fm'), relative fluorescence decrease (RFD), photochemical (qP) and non-photochemical fluorescence quenching (qN) of light adapted plants (saturation pulse method) were calculated. In illuminated plants the proportion of regulated (NPQ) and non-regulated (NO) non-photochemical quenching mechanisms was also calculated.

Performance of photosynthetic **electron transport** was investigated by means of rapid light curves (RLC) with 1 min light steps using Mini-PAM chlorophyll fluorometer (WALZ GmbH, Germany). Initial slope (α), maximal performance (ETR_{max}) and light saturating coefficient (E_k) of RLC were calculated.

After the measurements of chlorophyll fluorescence the plant material was centrifuged by 3000 rpm for 5 min to remove excess water. Fresh weights were measured with 0,0001g accuracy and samples were subsequently stored at -80 °C for further analyses.

Photosynthetic pigment content of plants was measured from 80% acetonetic extracts by spectrophotometric method (Shimadzu UV/VIS 1601).

6.2.3. Data evaluation

Effects of chromate were characterized by resulted changes in growth and physiological traits and expressed as percents of control values. Data processing (RGR, I%, mean, SD) was carried out by MS Excel 2003. Differences in chromate-induced changes were analysed by Student's t-test and significant differences were indicated at ⁺p<0,1 *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 significance levels (Systat Sigmaplot 10.0).

6.3. New scientific results

6.3.1. Differences in sensitivity of the tested duckweed species to Cr(VI) treatments

Our results revealed that the three studied duckweed species differed in sensitivity against chromate.

On the basis of growth rate inhibitions at 100 μ M Cr(VI) in long-term tests the order of sensitivity was: *L. minor* > *L. gibba* \approx *S. polyrrhiza*.

On the other hand short-term exposures to Cr(VI) resulted in different order of sensitivity on the basis of chlorophyll fluorescence method: *L. minor* > *S. polyrrhiza* > *L. gibba*.

Photochemical quenching of fluorescence (qP) showed a Cr(VI)-concentration dependent decrease in all tested duckweed species at the end of continuous illumination by actinic light. However, components of non-photochemical quenching (qN) showed a species-dependent pattern at the end of chromate treatments: proportion of non-regulated non-photochemical quenching (NO) increased in Cr(VI)-concentration dependent manner in *L. minor* and *S. polyrrhiza* cultures indicating the rising number of damaged PSII reaction centres. On the other hand in *L. gibba* cultures the decrease in photochemical efficiency ($\Delta F/F_m'$) was mainly the consequence of increase in regulated non-photochemical quenching (NPQ) which explains the higher tolerance of this species to short-term chromate exposure.

Similarly to the chlorophyll fluorescence parameters rapid light curves confirmed slower induction of electron transport in *S. polyrrhiza* compared to *L. gibba* and *L. minor* as well as the higher sensitivity of *L. minor* cultures to Cr(VI).

6.3.2. Differences in sensitivity of the measured parameters to Cr(VI) treatments

Although all measured growth parameters decreased due to 100 μ M Cr(VI) treatments by the end of tests we obtained differences in their sensitivity. Change in colony number of test cultures proved not to be a good indicator of Cr(VI) toxicity. Counting colonies could be, however, useful because changes in frond/colony ratios indicate different response of tested duckweed species to Cr(VI). Decreasing frond/colony ratios (i.e. disintegrating colonies) of treated *L. gibba* and *L. minor* cultures reflected oxidative damage in tested plants while *S. polyrrhiza* responded in the opposite way to chromate treatments exhibiting higher frond/colony ratios by the end of tests.

Among growth parameters frond numbers of test cultures proved to be less sensitive indicator compared to fresh and dry weights. Stronger

inhibition in biomass indicated decrease in average size of fronds due to Cr(VI) treatments.

By means of chlorophyll fluorescence method effects of chromate could be detected even within 48h, in contrast with the 3-4 days when growth inhibition started in long term tests.

Between the chlorophyll fluorescence parameters of dark adapted plants F_m/F_o showed higher sensitivity compared to F_v/F_m .

Our results showed that the actual photochemical efficiency ($\Delta F/F_m'$) of illuminated plants was more sensitive to Cr(VI) stress than its dark adapted analogue F_v/F_m .

Rapid light responses of the electron transport showed concentration-dependent inhibition by chromate in test plants. Both maximal light use efficiency (α) and ETR_{max} decreased strongly due to Cr(VI)-treatments.

By the end of short-term exposures the applied chromate concentrations induced slight decrease in photosynthetic pigment content of test plants but 48h long treatments were not long enough to result in such distinct species or concentration dependent differences as chlorophyll fluorescence parameters indicated. Stronger reduction in concentration of chl-*a* compared to that of chl-*b* suggested chromate-induced oxidative damage mainly affecting the PSII reaction centres which also explained the rise in Y(NO) values. Concentrations of carotenoids decreased less than that of chlorophylls indicating their higher stability to chromate-induced damages and the need for efficient antioxidative protection in coping with emerging oxidative stress. These results also indicated that parallel with decreasing number of operating PSII reaction centres increase of average antenna size per reaction centre appeared. The need for quenching the excess excitation energy can explain the measured increase of qN and NPQ values.

6.3.3. Differences in growth and anthocyanin accumulating capacity of *S. polyrrhiza* ecotypes and their responses to Cr(VI)

The two ecotypes of *S. polyrrhiza* exhibited differences in accumulation of anthocyanins. One of them have been described as MA-ecotype accumulating anthocyanins in large amount, as revealed by both spectrophotometric method and digitalized photo evaluation procedure. The other one have been characterized as AA-ecotype after its low anthocyanin accumulating capacity. The two ecotypes showed different growth under same culturing conditions. The MA-ecotype with large anthocyanin accumulation had lower growth rate due to the utilization of surplus carbon and energy in anthocyanin production which may be disadvantageous under 'natural' competitive conditions. AA-ecotype exhibited tenfold lower anthocyanin accumulating capacity than MA-ecotype did.

The induction of anthocyanin accumulation due to chronic chromate stress and differences in Cr(VI) tolerance of two *S. polyrrhiza* ecotypes suggests the probability of antioxidative role of anthocyanins in test plants. Based on the results of growth inhibition the MA-ecotype proved to be less sensitive within 0-50 μM Cr(VI) concentration range than AA-ecotype. 100 μM Cr(VI) proved to be high enough to diminish the development of additional protection by anthocyanins against chromate. At this concentration reduction of growth rates were more or less the same in both ecotypes. These results suggested that anthocyanin accumulation under certain conditions such as in heavy metal or pesticide contaminated habitats could be profitable. Accumulation of anthocyanins and the induction of this accumulation in *S. polyrrhiza* under chromate stress could explain the different sensitivity of growth and chlorophyll fluorescence parameters of this species compared to those of *L. gibba* and *L. minor* in short- and long-term treatments.

6.3.4. Testing the applicability of anthocyanin accumulation as potential biomarker in *S. polyrrhiza*

Spectrophotometric measurements confirmed the increase of anthocyanin contents in both ecotypes of *S. polyrrhiza* parallel with increase of Cr(VI) concentrations by the 10th day of chromate treatments. Similarly to our results accumulation of anthocyanins in *S. polyrrhiza* was observed under other stress conditions therefore we studied whether anthocyanin content can be used as a nonspecific biomarker.

An image processing method has been worked out for *in vivo* measurement of anthocyanic leaf segments in the cultures of *S. polyrrhiza*. This *in vivo* technique has made possible the estimation of anthocyanin accumulation with a good accordance to results of spectrophotometric method. Further improvements of the method could take closer to development of a non-destructive, *in vivo*, easy to use and cheap measuring system which can be used for detection of the effects of heavy metals and other stressors with higher sensitivity than the growth parameters.

6.3.5. Implementation of the most important results in practice

On the basis of our results *L. gibba*, *L. minor* and *S. polyrrhiza* cultured under the same conditions differed in sensitivity against Cr(VI) treatments. Being widely used model organisms in ecotoxicology and physiological research there is a growing need for knowledge about the differences among species in order to get comparable data by duckweed tests.

Chlorophyll fluorescence induction method proved to be a suitable tool in assessing general toxicity of contaminants in duckweed tests. Changes in

chlorophyll fluorescence parameters appear faster in comparison with growth inhibition. The shorter response time of these parameters could be particularly important in the case of accidental contaminations. Use of chlorophyll fluorescence parameters of light acclimated plants allows us to characterize separate processes of photosynthesis. Data obtained by this way makes possible specific non-destructive analyses of the effect of various contaminants and search for possible new biomarkers.

Results of our experiments with *S. polyrrhiza* confirmed the supposed role of anthocyanins in coping with oxidative damage as non-enzymatic antioxidants. Stress-induced anthocyanin accumulation in *S. polyrrhiza* could be a suitable non-specific biomarker in ecotoxicological studies e.g. on water quality. Both spectrophotometric measurements of plants' extracts and digital analysis of 'anthocyanic' leaflet segments proved that anthocyanin accumulation can be used as more sensitive process to stress factors than growth.

7. IRODALOMJEGYZÉK

AFNOR 1996: Determination of the inhibitory effect on the growth of *Lemna minor* XP T 90-337.

Ali, N.A., Dewez, D., Didur, O., Popovic, R. 2006: Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. *Photosynthesis Research*, 89: 81-87.

APHA 1992: Toxicity Part 8000 8-32-8-39 in: Standard methods for the examination of water and wastewater 18th ed., APHA, AWWA, WEF, Washington

Appenroth, K.-J., Bischoff, M., Gabrys, H., Stoeckel, J., Swartz, H.M., Walczak, T., Winnefeld, K. 2000: Kinetics of chromium(V) formation and reduction in fronds of the duckweed *Spirodela polyrhiza* - a low frequency EPR study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 78: 235-242.

Appenroth, K.-J., Stöckel, J., Srivastava, A., Strasser, R.J. 2001: Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environmental Pollution*, 115: 49-64.

Appenroth, K.-J. Luther, A., Jetschke, G., Gabrys, H. 2008: Modification of chromate toxicity by sulphate in duckweeds (Lemnaceae). *Aquatic Toxicology*, 89: 167-171.

Artetxe, U., García-Plazaola, J.I., Hemández, A., Becerril, J., M. 2002: Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 859-863.

ASTM 1991: Conducting static toxicity tests with *Lemna gibba*. Guide E 1415-91. Annual book of ASTM standards. Section 11 Water and environmental technology. Vol. 11.04. ASTM, Philadelphia, U.S.

Bassi, M., Corradi, M.G., Ricci, A. 1990: Effects of chromium (VI) on two freshwater plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes* 2 Biochemical and physiological observations. *Cytobios*, 62: 101-109.

Bergman, B.A., Cheng, J., Classen, J., Stomp, A.-M. 2000: *In vitro* selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresource Technology*, 73: 13-20.

Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Öquist, G. 1993: Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, D.O., Scurlock, J.M., O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (eds.): *Photosynthesis and*

Production in Changing Environment: a field and laboratory manual. Chapman & Hall, London, pp: 193-206.

Bowker, D.W., Duffield, A.N., Denny, P. 1980: Methods for the isolation, sterilization and cultivation of Lemnaceae. *Freshwater Biology*, 10: 385-388.

Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R. 2001: Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 335-47.

Chalker-Scott, L. 1999: Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70: 1-9.

Chandra, P., Kulshreshtha, K. 2004: Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *The Botanical Review*, 70: 313-327.

Close, D.C., Beadle, C., L. 2003: The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69: 149-161.

Cormier, S.M., Daniel, F.B., 1994: Biomarkers: Taking the science forward. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 1011-1012.

Crawford, D.J., Landolt, E. 1993: Allozyme Studies in Spirodela (Lemnaceae): Variation among conspecific clones and divergence among the species. *Systematic Botany*, 18: 389-394.

Crawford, D.J., Landolt, E., Les, D.H., Archibald, J.K., Kimball R.T. 2005: Allozyme variation within and divergence between *Lemna gibba* and *L. disperma*: Systematic and biogeographic implications. *Aquatic Botany*, 83: 119-128.

Datko, A.H., Mudd, S., H. 1984: Sulfate uptake and its regulation in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746. *Plant Physiology*, 75: 466-473.

Dickinson, M.B., Miller, T.E. 1998: Competition among small, free-floating, aquatic plants. *American Midland Naturalist*, 140: 55-67.

Dirilgen, N. 1998: Effects of pH and chelator EDTA on Cr toxicity and accumulation in *Lemna minor*. *Chemosphere*, 37: 771-783.

Doong, R.L., Macdonald, G.E., Shilling, D.G. 1993: Effect of fluridone on chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content of Hydrilla. *Journal of Aquatic Plant Manager*, 31: 55-59.

Driever, S.M., van Nes, E.H., Roijackers, R.M.M. 2005: Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. *Aquatic Botany*, 81: 245-251.

Drinovec, L., Drobne, D., Jerman, I., Zrimec, A. 2004: Delayed fluorescence of *Lemna minor*: A biomarker of the effects of copper,

cadmium, and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 896-902.

Eberius, M., Mennicken, G., Reuter, I., Vandenhirtz, J. 2000: Sensitivity of different growth inhibition tests-Just a question of mathematical calculation? *Ecotoxicology*, 11: 293-297.

Eberius, M. 2001a: Assessment of inhibition values and comprehensive analysis of biotests. LemnaTec Literature, www.umwelt-analyse.de

Eberius, M. 2001b: Observation parameters of the duckweed growth inhibition test: frond number - total frond area - dry weight. LemnaTec Literature, www.umwelt-analyse.de

Environment Canada 1999: Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte *Lemna minor*. Report EPS 1/RM/37.

EPA 1996: Ecological effects test Guidelines OPPTS 850.4400 Aquatic plant toxicity test using *Lemna* spp., Tiers I and II, EPA 712-C-96-156.

Felföldy, L. 1990: Hínárhatározó. *Vízügyi Hidrobiol.*, 18. Vízdok., Budapest.

Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M. 2003: Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: Application to seagrasses. *Aquatic Toxicology*, 65: 187-204.

Filbin, G.J., Hough, R.A. 1985: Photosynthesis, photorespiration, and productivity in *Lemna minor* L. *Limnology and Oceanography*, 30: 322-334.

Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G. 2003: Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. *Environmental and Experimental Botany*, 49: 159-168.

Garg, P., Chandra, P. 1990: Toxicity and accumulation of chromium in *Ceratophyllum demersum* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 473-478.

Gensemer, R.W., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. 1999: Using chlorophyll a fluorescence to detect the onset of anthracene photoinduced toxicity in *Lemna gibba*, and the mitigating effects of a commercial humic acid. *Limnology and Oceanography*, 44: 878-888.

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1989: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990: 87-92.

Gitz, D.C., Liu-Gitz, L., McClure, J.W., Huerta, A.J. 2004: Effects of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia* (Koch.). *Journal of Experimental Botany*, 55: 919-927.

González, L. 2001: Determination of photosynthetic pigments. In: Roger, M., J., R. (ed.): *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp: 97-112.

Gould, K.S., 2004: Nature's swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004: 314-320.

Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E., Faure, O., Hitmi, A., Ledoigt, G., 2009: Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1446-1452.

Grime, J., P. 1979: *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley & Sons., New York.

Han, F.X., Sridhar, M.B.B., Monts, D.M., Su, Y. 2004: Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. *New Phytologist*, 162: 489-499.

Hatier, J.-H., B., Gould, K.S. 2008: Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. *Journal of Theoretical Biology*, 253: 625– 627.

Henzler, T., Steudle, E. 2000: Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *Journal of Experimental Botany*, 51: 2053–2066.

Hörcsik, T.Zs., Szalay, G., Pál, M., Oláh, V., Mészáros, I., Lakatos, Gy., Balogh, Á. 2004: Fitokelatinok előfordulása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) stressz hatására. *Hidrológiai Közöny* 84: 50-52.

Hörcsik, T.Zs., Oláh, V., Domina, R., Mészáros, I., Lakatos, Gy., Balogh, Á. 2005: Szénhidrát-anyagcsere változása *Chlorella pyrenoidosa*-ban Cr(VI) és Cd stressz hatására. *Hidrológiai Közöny*, 85: 47-49.

Hörcsik, T.Zs., Oláh, V., Balogh, Á., Mészáros, I., Simon, L., Lakatos, Gy. 2006: Effect of Chromium(VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biologica Szegediensis*, 50: 19-23.

Hörcsik, Zs.T., Kovács, L., Láposi, R., Mészáros, I., Lakatos, G., Garab, G. 2007: Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Photosynthetica*, 45: 65-69.

Hutner, S. 1953: Comparative physiology of heterotrophic growth. In: Loomis, E.D. (Ed.), Growth and Differentiation of Plants. Iowa State College Press, Ames, Iowa, pp. 417–446.

Ince, N.H., Dirilgen, N., Apikyan, I.G., Tezcanli, G., Üstün, B. 1999: Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: a statistical approach. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 36: 365-372.

ISO/CD 15799 1999: Soil quality - Guidance on the ecotoxicological characterizations of soil and soil materials.

Jansen, M.A.K., Noort, R.E., van den, Boeke, S.J., Huggers, S.A.M., de Haan, J.H., 1999: Differences in UV-B tolerance among *Spirodela punctata* ecotypes. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 48: 194-199.

Juneau, P., Popovic, R. 1999: Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: Importance and future application. Ecotoxicology, 8: 449-455.

Juneau, P., El Berdey, A., Popovic, R., 2002: PAM Fluorometry in the Determination of the Sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to Copper. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 42: 155–164.

Juneau, P., Surnitorno, H., Matsui, S., Itoh, S., Kirn, S.-G., Popovic, R. 2003: Use of chlorophyll fluorescence of *Closterium ehrenbergii* and *Lemna gibba* for toxic effect evaluation of sewage treatment plant effluent and its hydrophobic components. Ecotoxicology and Environmental Safety, 55: 1–8.

Kanoun-Boulé, M., Vicente, J.A.F., Nabais, C., Prasad, M.N.V., Freitas, H. 2009: Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. Aquatic Toxicology, 91: 1-9.

Kaszycki, P., Gabrys, H., Appenroth, K.-J., Jaglarz, A., Sedziwy, S., Walczak, T., Koloczek, H. 2005: Exogenously applied sulphate as a tool to investigate transport and reduction of chromate in the duckweed *Spirodela polyrhiza*. Plant, Cell and Environment, 28: 260-268.

Keresztúri, P., Lakatos, Gy., Tóth, A., Mészáros, I., Paksi, V. 2006: Exploration of the environmental impact of leather processing to the heavy metal contents of natural vegetation - a long-term case study. Environmental Aspects of Trace Element Research – Water, Soil, Microorganisms, Plants pp: 206-209.

Kleiman, I.D., Cogliatti D.H. 1997: Uptake of chromate in sulfate deprived wheat plants. Environmental Pollution, 97: 131-135.

- Klughammer, C., Schreiber, U. 2008:** Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. PAM Application Notes, 1: 27-35.
- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., Brouillard, R. 2003:** Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry, 64: 923-933.
- Kós, P.B., Oláh, R., Zok, A., Horváth, G.V., Szegedi, E., Váradi, Gy., Bálo, B., Hideg, É. 2008:** The role of ferritin in enhancing the stress tolerance of grapevine. Acta Biologia Szegediensis, 52: 41-43.
- Krupa, Z., Baranowska, M., Orzol, D. 1996:** Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? Acta Physiologiae Plantarum, 18: 147-151.
- Kumar, V., Sharma, S.S. 1999:** Nutrient deficiency-dependent anthocyanin development in *Spirodela polyrhiza* L. Schleid. Biologia Plantarum, 42: 621-624
- Lakatos, G., Mészáros, I., Bohátka, S., Szabó, S., Makádi, M., Csatlós, M., Langer, G. 1993:** Application of Lemna species in ecotoxicological studies of heavy metals. The Science of the Total Environment, 44: 773-778.
- Lakatos, G., Fleit, E., Mészáros, I. 2003:** Ecotoxicological studies and risk assessment on the cyanide contamination in Tisza river. Toxicology Letters, 140-141: 333-342.
- Landolt, E. 1957:** Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 67: 271-410.
- Lasfar, S., Monette, F., Millette, L., Azzouz, A. 2007:** Intrinsic growth rate: A new approach to evaluate the effects of temperature, photoperiod and phosphorus–nitrogen concentrations on duckweed growth under controlled eutrophication. Water Research, 41: 2333-2340.
- Lemon, G.D., Posluszny, U., Husband, B.C. 2001:** Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, and *Wolffia borealis*. Aquatic Botany, 70: 79-87.
- Les, D.H., Crawford, D.J., Landolt, E., Gabel, J.D., Kimball, R.T. 2002:** Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family. Systematic Botany 27: 221-240.
- Li, T.Y., Xiong, Z.T. 2003:** Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety, 59: 174-179.

Li, T.Y., Xiong, Z.T. 2004: A novel response of wild-type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals. *Environmental toxicology*, 19: 95-102.

Lichtenthaler, H.K. Buschmann, C., Rindelre, U., Schmuck, G., 1986: Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat Environmental Biophysics*, 25: 297-308.

Lichtenthaler, H.K. 1996: Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148: 83-116.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Knapp, M., 2005: How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RfD of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43: 379-393.

Mancinelli, A. 1984: Photo-regulation of anthocyanin synthesis VIII. Effects of light pre-treatments. *Plant Physiology*, 75: 447-453.

Manetas, Y. 2006: Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora*, 201: 163-177.

McClure, J.W., Alston, R.E. 1966: A chemotaxonomic study of Lemnaceae. *American Journal of Botany*, 53: 849-860.

Mészáros, I., Lakatos, G., Veres, Sz., Papp, A., Lánszki, I. 1998: Screening of glyphosate- induced changes in photosynthesis of duckweed by using chlorophyll fluorescence induction method. In: Garab, G. (ed.) 1998: *Photosynthesis Mechanisms and Effects*, Kluwer Publishers, Vol. V: 4077-4080.

Micera, G., Dessi, A., 1988: Chromium adsorption by plant roots and formation of long-lived Cr(V) species: An ecological hazard? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 34: 157-166.

Mkandawire, M., Dudel, E.G. 2005a: Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Science of the Total Environment*, 336: 81-89.

Mkandawire, M., Dudel, E.G. 2005b: Assignment of *Lemna gibba* L. (duckweed) bioassay for in situ ecotoxicity assessment. *Aquatic Ecology*, 39: 151-165.

Moore, J.W., Ramamoorthy, S. 1984: Heavy metals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment. Springer Verlag, New York, pp. 58-76.

Naumann, B., Eberius, M., Appenroth, K.-J. 2007: Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the

duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. Journal of Plant Physiology, 164: 1656-1664.

Nichols, P.B., Couch, J.D., Al-Hamdani, S.H. 2000: Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. Aquatic Botany, 68: 313-319.

Oborny, B., Bartha, S. 1998: Formakincs és közösségszerveződés a növénytársulásokban: a klonális növények szerepe. In: Fekete G. (szerk.) A közösségi ökológia frontvonalai. Scientia Kiadó, Budapest, pp. 59-86.

OECD 1998: Draft OECD test guideline 221 – Lemna growth inhibition test

Oláh V., Gáspár A., Láposi R., Cseke G., Veres Sz, Lakatos Gy., Mészáros I. 2003: A klorofill-fluoreszcencia indukció módszer alkalmazása Lemna-tesztekben vízszennyezések ökotoxikológiai hatásainak tanulmányozására. Hidrológiai Közlöny, 83: 110-111.

Oláh V., Hörcsik T.Zs., Cseke G. Láposi R. Veres Sz., Gáspár A., Lakatos Gy., Mészáros I. 2004: A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* és a *Lemna gibba* növekedésére és fotoszintézis aktivitására. Hidrológiai Közlöny, 84: 112-114.

Oláh V., Cseke G., Hörcsik T.Zs., Veres Sz., Lakatos Gy., Mészáros I. 2005: A króm (VI) hatásának vizsgálata békalencse-tesztekben a klorofill fluoreszcencia indukció paraméterek alapján. Hidrológiai Közlöny, 85: 108-110.

Oláh V., Szöllősi E., Varga É., Kiss T., 2008a: Chromium (VI) induced inhibition of photosynthesis and growth in duckweed. Cereal Research Communications, 36: 319-322.

Oláh V., Tóth Gy.D., Szöllősi E., Kiss T. 2008b: Comparative study on sensitivity of different physiological properties of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden to Cr(VI) treatments. Acta Biologica Szegediensis, 52: 181-182.

Oláh V., Kiss T., Tóth Gy.D., Surányi Gy., Szöllősi E. 2008c: Bojtos békalencse (*Spirodela polyrrhiza*) ökotípusok króm (VI)-toleranciájának vizsgálata. Hidrológiai Közlöny, 88: 147-149.

Oláh V., Kiss T., Tóth Gy.D., Lakatos Gy., Mészáros I. 2008d: Hazai békalencse-fajok nehézfém-toleranciája. IV. Kárpát-Medencei Környezettudományi Konferencia, Debrecen, Konferenciakiadvány II. kötet, 160-166.

Oláh V., Combi Zs., Szöllősi E., Kanalas P., Mészáros I., 2009a: Anthocyanins: possible antioxidants against Cr(VI) induced oxidative stress in *Spirodela polyrrhiza*. Cereal Research Communications, 37: 533-536.

Oláh V., Szöllősi E., Szabó Sz., Gyulai I., Mészáros I. 2009b: A *Spirodela polyrrhiza* antocián-felhalmozása, mint lehetséges biomarker ökotoxikológiai tesztekben. Hidrológiai Közlöny, 89: megjelenés alatt

Oláh, V., Szöllősi, E., Kanalas, P., Lakatos, Gy., Mészáros I. 2009c: Magyarországi békalencse-fajok stressz-toleranciája. V. Kárpát-Medencei Környezettudományi Konferencia, Kolozsvár, Konferenciakiadvány, 263-267.

Panda, S.K., Chaudhury, I., Khan, M.H. 2003: Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, 46: 289-294.

Panda, S.K., Choudhury, S. 2005: Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 95-102.

Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde J., Cid, A. 2009: Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environment International*, 35: 240-247.

Prasad, M.N.V. 1997: Trace metals. In: *Plant Ecophysiology*, Prasad, M., N., V. (ed.) John Wiley & Sons, Inc. 1997 ISBN: 0-471-13157-1 pp: 207-251.

Ralph, P.J., Gademan, R. 2005: Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany*, 82: 222-237.

Rocchetta, I., Mazzuca, M., Conforti, V., Ruiz, L., Balzaretto, V., Molina, M.C.R. 2005: Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environmental Pollution* 141: 353-358.

Saroussi, S., Beer, S. 2007: Alpha and quantum yield of aquatic plants derived from PAM fluorometry: Uses and misuses. *Aquatic Botany*, 86: 89-92.

Schauber, E.M., Edge, W.D., Wolf, J.O. 1995: Influence of vegetation height on the distribution and persistence of insecticide residues on alfalfa and soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29: 449-454.

Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. 1994: Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze, E-D. Caldwell, M.M. (eds.) 1994: *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer Verlag, Berlin, 49-70.

Serôdio J., Vieira, S., Cruz, S., Coelho, H. 2006: Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: relationship to steady-state

light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages. *Photosynthesis Research*, 90: 29-43.

Severi, A. 2001: Toxicity of selenium to *Lemna minor* in relation to sulfate concentration. *Physiologia Plantarum*, 113: 523–532.

Selye, H. 1956: *The Stress of Life*. McGraw-Hill, New York.

Shanker, A.K., Pathmanabhan, G. 2004: Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Plant and Soil*, 256: 141-151.

Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C.N., Pathmanabhan, G. 2004a: Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science*, 166: 1035-1043.

Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Jayaram, K., Pathmanabhan, G. 2004b: Expression of metallothionein 3-like protein mRNA in sorghum cultivars under chromium (VI) stress. *Current Science*, 86: 901-902.

Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. 2005: Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31: 739– 753.

Sinha, S., Saxena, R., Singh, S. 2005: Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere*, 58: 595–604.

SIS 1995: Swedish Institute of Standards, Water quality - determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed SS 02 82 13

Sobrero, M.C., Beltrano, J., Ronco, A.E. 2004: Comparative response of Lemnaceae clones to copper(II), chromium(VI), and cadmium(II) toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73: 416-423.

Spencer D.F., Ksander, G.G. 1990: Influence of temperature, light and nutrient limitation on anthocyanin content of *Potamogeton gramineus* L. *Aquatic Botany*, 38: 357-367.

Susplugas, S., Srivastava, A., Strasser R.J. 2000: Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrhiza*: Effect of chromate. *Journal of Plant Physiology*, 157: 503-512

Szikszai, Z., Kertész, Zs., Kocsár, I., Oláh, V. 2008: Quantitative elemental localisation in plants using ion beam microprobe analysis. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 81-83..

Teisseire, H., Couderchet, M., Vernet, G. 1998: Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 194-200.

Teisseire, H., Vernet, G. 2000: Ascorbate and glutathione contents in duckweed, *Lemna minor*, as biomarkers of the stress generated by copper, folpet and diuron. *Biomarkers*, 5: 263-273.

Tkalec, M., Vidaković –Cifrek, Z., Regula, I. 1998: The effect of oil industry "high density brines" on duckweed *Lemna minor* L. *Chemosphere*, 37: 2703-2715.

Tripathi, R.D., Chandra, P. 1991: Chromium uptake by *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden in relation to metal chelators and pH. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 764-769.

Vasseur, L., Aarssen, L.W., Bennett, T. 1993: Allozymic variation in local apomictic populations of *Lemna minor* (Lemnaceae). *American Journal of Botany*, 80: 974-979.

Vervliet-Scheebaum, M., Knauer, K., Maund, S.J., Grade, R., Wagner, E. 2006: Evaluating the necessity of additional aquatic plant testing by comparing the sensitivities of different species. *Hydrobiologia*, 570: 231–236.

Visnovitz, T., Soós, V., Lásztity, D., Rácz, I., Szigeti, Z. 2008: Recent advances in understanding of the mechanism of paraquat resistance. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 103-104.

Vivek, D., Vivek, P., Radhey, S. 2000: Differential antioxidative responses to cadmium in root and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52:358.

Wang, W. 1984: Chromate ion as a reference toxicant for aquatic phytotoxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6: 409-414.

Weiss, O., Roger, M.J.R. 2001: Modulated fluorescence. In: Roger, M., J., R. (ed.): *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp: 173-183.

Wellburn, A.R. 1994: The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307-313.

Zayed, A., Lytle, A.C., Qian, J.H., Terry, N. 1998: Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta*, 206: 293-299.

Zimmerman, W.J. 1985: Biomass and pigment production in three isolates of *Azolla* II. Response to light and temperature stress. *Annals of Botany*, 56: 701-709.

8. FÜGGELÉK

Rövidítés- és fogalommagyarázat

A₅₃₀: az Értekezésben a *S. polyrrhiza* teszt-tenyészetekből készített metanolos kivonatok 530 nm-en mért abszorbanciája, amely alapján, a 657 nm-en mért abszorbanciaértékkel történő korrigálás, és egységnyi friss- vagy száraztömegre illetve levélfelületre vonatkoztatás után a növények antocián-tartalmát jellemeztük.

AA-ökotípus: az Értekezésben a *S. polyrrhiza* Kis-balatoni, kevesebb antociánt felhalmozó ökotípusának jelölése („AA” = alacsony antocián tartalom)

Aktiváló fény: a klorofill fluoreszcencia paraméterek mérése során az állandó vagy változó intenzitású megvilágító fény, melynek intenzitása elegendő a fluoreszcencia kioltó mechanizmusok aktiválásához, azaz a fotokémiai rendszerek indukálásához

Cr(VI): az Értekezésben a hexavalens króm, illetve a kromát ion rövidítése

EC₅₀: közepes effektív koncentráció. Valamely anyagnak azon koncentrációja, amely meghatározott kezelési idő után valamely életfolyamatban a mért maximális és alapértékekhez viszonyítva 50%-os változást eredményez. Számolása többféle képlet szerint történhet, a legegyszerűbb: $Y = \text{MIN} + (\text{MAX} - \text{MIN}) / (1 + (X / \text{EC}_{50})^{\text{Hill}})$ együttható ahol: MIN=a legalacsonyabb mért érték; MAX=a legmagasabb mért érték; Hill együttható=a dózis-válasz görbe maximális meredeksége

Ek: Az ETR-fényválasz görbe fényteltési együtthatója ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), számolása az $Ek = \alpha / \text{ETR}_{\text{max}}$ képlet alapján történik, ahol a=maximális fotonhasznosítási együttható, ETR_{max} =az adott gyors fényválasz-görbe maximális értéke.

ETR: a fotoszintézis $\text{ETR} = \text{YIELD} * \text{PAR} * 0,5 * 0,84$ képlet alapján számolt relatív elektrontranszport rátája ($\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

ETR_{max}: az ETR-fényválasz görbék vizsgálata során az elektrontranszport ráta legmagasabb mért értéke ($\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Fényadaptált állapot: a PSII-ben az aktiváló fényvel történő megvilágítás során bekövetkező állapot, amikor a fluoreszcencia kioltó mechanizmusok működésbe lépnek

Fm/Fo: a sötétadaptált mintákban a maximális- (Fm) és alapfluoreszcencia (Fo) hányadosa, arányos a PSII fotokémiai hatékonyságával

Fv/Fm: a sötétadaptált mintákban a PSII $(Fm - Fo) / Fm$ képlet alapján számolt potenciális fotokémiai hatékonysága

ft: a tenyészetek frisstömege

I%: a tenyészetek fejlődésének az $I\% = [(RGR_{\text{kontroll}} - RGR_{\text{kezelt}})/RGR_{\text{kontroll}}] * 100$ képlet alapján számolt gátlása, ahol RGR_{kontroll} = a kontroll tenyészet adott paraméterre vonatkoztatott növekedési rátája, RGR_{kezelt} = a kezelt tenyészet adott paraméterre vonatkoztatott növekedési rátája

IC₅₀: a közepes gátlás koncentrációja. Valamely anyagnak azon koncentrációja, amely meghatározott kezelési idő után valamely életfolyamatban a mért maximális értékhez viszonyítva 50%-os gátlást eredményez. Az Értekezésben megfelel az adott jellemző $I\% = 50\%$ -nál megfigyelt értéknek.

kar: az Értekezésben a békalencse teszt-tenyészetek acetonos kivonatából spektrofotometriás méréssel meghatározott, frisstömegegre vonatkoztatott összkarotinoid-tartalom ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)

kar/kl: az Értekezésben a békalencse teszt-tenyészetek acetonos kivonatából spektrofotometriás méréssel meghatározott, frisstömegegre vonatkoztatott összkarotinoid- és összklorofill-tartalom aránya (mg mg^{-1})

kl-a: az Értekezésben a békalencse teszt-tenyészetek acetonos kivonatából spektrofotometriás méréssel meghatározott, frisstömegegre vonatkoztatott klorofill-a tartalom ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)

kl-b: az Értekezésben a békalencse teszt-tenyészetek acetonos kivonatából spektrofotometriás méréssel meghatározott, frisstömegegre vonatkoztatott klorofill-b tartalom ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)

kla+b: az Értekezésben a békalencse teszt-tenyészetek acetonos kivonatából spektrofotometriás méréssel meghatározott, frisstömegegre vonatkoztatott összklorofill tartalom ($\text{mg g}_{\text{ft}}^{-1}$)

kla/b: az Értekezésben a békalencse teszt-tenyészetek acetonos kivonatából spektrofotometriás méréssel meghatározott, frisstömegegre vonatkoztatott klorofill-a és klorofill-b tartalom aránya (mg mg^{-1})

Kolónia: egymással összenőtt, összefüggő, egy „növényegyednek” tekinthető rametek halmaza

LHC2: a második fotokémiai rendszer fénygyűjtő antennarendszere (Light Harvesting Complex 2)

MA-ökotípus: az Értekezésben a *S. polyrrhiza* kunszentmártoni, több antociánt felhalmozó ökotípusának jelölése („MA” = magas antocián tartalom)

NS: nem szignifikáns különbség a középértékek között a Student-féle t-próba alapján.

Ramet: az Értekezésben a békalencse-kolóniák legkisebb, önálló szaporodásra képes egysége, többnyire lapos, gyökérrel rendelkező, „levélszerű” képződmény, amely tulajdonképpen megfelel a törzsfajlás során egy fizikai egységgé redukálódott hajtásrésznek (az angol szakirodalomban „frond” illetve „thallus”)

REL %: relatív elektrolit szivárgás; az inkubációs közeg vezetőképességének változása alapján, a $REL\% = (EC1/EC2) \cdot 100$ képlet alapján számolt, a sérült sejtmembránok permeabilitásával, azaz közvetve az oxidatív stressz mértékével arányos paraméter

RFD: a fényadaptált mintáknak az $RFD = (F_m - F_t)/F_t$ képlet alapján számolt relatív fluoreszcencia csökkenése, „vitalitási index”

RGR: a $(\ln x_t - \ln x_0)/t$ alapján számolt növekedési ráta, ahol $x_0 = a$ kiindulási érték (ramet- kolóniaszám, biomassza, stb), $x_t = a$ t időpontban mért érték, t=idő (napok száma)

SLM (specifikus levéltömeg): A vizsgált növényi minta egységnyi felületre vonatkoztatott száraztömege, a Dolgozatban az értéke $mg_{sz} mm^{-2}$ egységben kifejezve.

Sötétadaptált állapot: az Értekezésben a PSII húsz perc sötétben történő inkubációja után bekövetkező állapot, melynek során az összes reakciócentrum relaxált, „nyitott” állapotba kerül

Szaturációs pulzus: az Értekezésben a klorofill fluoreszcencia paraméterek vizsgálata során a maximális fluoreszcencia (F_m) eléréséhez alkalmazott rövid fényfelvillanás, melynek intenzitása ($\sim 6000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) elegendő a PSII reakciócentrumok „telítéséhez”

Tenyészet: az Értekezésben a békalencse-tesztek alapegysége, a tesztek során az egy lombikban kezelt növények összessége

Szárazanyag-tartalom (sza %): a tenyészetek száraztömeg/frisstömeg aránya, százalékban megadva: a $sza\% = (szt/ft) \cdot 100$ képlet alapján

szt: a tenyészetek száraztömege

α : az ETR-fényválasz görbék kezdeti meredeksége, maximális fotonhasznosítási együttható (mol elektron mol foton⁻¹)

$\Delta F/F_m'$: a fényadaptált mintákban a PSII $(F_m' - F_o')/F_m'$ képlet alapján számolt aktuális fotokémiai hatékonyság

A jelölt tudományos tevékenysége

1. Az értekezés témakörében megjelent referált közlemények jegyzéke

Oláh, V., Gáspár, A., Láposi, R., Cseke, G., Veres, Sz., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2003: A klorofill-fluoreszcencia indukció módszer alkalmazása Lemna-tesztben vízszennyezések ökotoxikológiai hatásainak tanulmányozására. Hidrológiai Közlöny, 83: 110-111.

Oláh, V., Hörsik, T.Zs., Cseke, G., Láposi, R., Veres, Sz., Gáspár, A., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2004: A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* és a *Lemna gibba* növekedésére és fotoszintézis aktivitására. Hidrológiai Közlöny, 84: 112-114.

Oláh, V., Cseke, G., Hörsik, T.Zs., Veres, Sz., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2005: A króm(VI) hatásának vizsgálata békalencse-tesztben a klorofill fluoreszcencia indukció paraméterek alapján. Hidrológiai Közlöny, 85: 108-110.

Oláh, V., Szöllősi, E., Varga, É., Kiss, T., 2008: Chromium (VI) induced inhibition of photosynthesis and growth in duckweed. Cereal Research Communications, 36: 319-322. IF: 1,190 (2007)

Oláh V., Tóth, Gy.D., Szöllősi, E., Kiss, T. 2008: Comparative study on sensitivity of different physiological properties of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden to Cr(VI) treatments. Acta Biologica Szegediensis, 52: 181-182.

Oláh, V., Kiss, T., Tóth, Gy.D., Surányi, Gy., Szöllősi, E. 2008: Bojtos békalencse (*Spirodela polyrrhiza*) ökotípusok króm(VI)-toleranciájának vizsgálata. Hidrológiai Közlöny, 88: 147-149.

Oláh, V., Combi, Zs., Szöllősi, E., Kanalas, P., Mészáros, I., 2009: Anthocyanins: possible antioxidants against Cr(VI) induced oxidative stress in *Spirodela polyrrhiza*. Cereal Research Communications, 37: 533-536. IF: 1,190 (2007)

Oláh, V., Szöllősi, E., Szabó, Sz., Gyulai, I., Mészáros, I. 2009: A *Spirodela polyrrhiza* antocián-felhalmozása, mint lehetséges biomarker ökotoxikológiai tesztben. Hidrológiai Közlöny, 89: 158-160.

2. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények jegyzéke

Hörsik, T.Zs., Szalay, G., Pál, M., **Oláh, V.,** Mészáros, I., Lakatos, Gy., Balogh Á. 2004: Fitokelatinok előfordulása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) stressz hatására. Hidrológiai Közlöny, 84: 50-52.

Hörcsik, T.Zs., **Oláh, V.**, Domina, R., Mészáros, I., Lakatos, Gy., Balogh, Á. 2005: Szénhidrát-anyagcsere változása *Chlorella pyrenoidosa*-ban Cr(VI) és Cd stressz hatására. Hidrológiai Közöny, 85: 47-49.

Hörcsik, T.Zs., **Oláh, V.**, Balogh, Á., Mészáros, I., Simon, L., Lakatos, Gy. 2006: Effect of Chromium(VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Biologica Szegediensis, 50: 19-23.

Szikszai, Z., Kertész, Zs., Kocsár, I., **Oláh, V.** 2008: Quantitative elemental localisation in plants using ion beam microprobe analysis. Acta Biologica Szegediensis, 52: 81-83.

3. Az értekezés témakörében konferencia kiadványokban megjelent teljes közlemények jegyzéke

Oláh, V., Kiss, T., Tóth, Gy.D., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2008: Hazai békalencse-fajok nehézfém-toleranciája. In: Orosz, Z., Szabó, V., Molnár, G., Fazekas, I., (eds.): IV. Kárpát-Medencei Környezettudományi Konferencia, Debrecen, 2008. március 28-29. (előadás) Konferenciakiadvány II. kötet, 160-166. ISBN 978-963-06-4625-3

Oláh, V., Szöllősi, E., Kanalas, P., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2009: Magyarországi békalencse-fajok stressz-toleranciája. In: Mócsy, I., Szacsvai, K., Urák, I., Zsigmond, A.R. (eds.): V. Kárpát-Medencei Környezettudományi Konferencia, Kolozsvár, 2009. március 26-29. (poszterbemutató) Konferenciakiadvány, 263-267. ISSN 1842-9815

4. Egyéb megjelent vagy közlésre elfogadott közlemények jegyzéke

Koncz, P., Gáspár, A., **Oláh, V.**, Elek, L., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2005: Variability of leaf growth characteristics in the canopy of sessile oak and Austrian oak. Acta Biologica Szegediensis, 49: 149-150.

Mészáros, I., Láposi, R., Veres, Sz., Sárvári, É., Gáspár, A., Bai, E., **Oláh, V.**, Lakatos, Gy. 2005: Effects of supplemental UV-B radiation on photosynthesis performance and UV-B absorbing compounds in leaves of two oak species. Acta Biologica Szegediensis, 49: 165-166.

Veres, Sz., Tóth, V.R., Láposi, R., **Oláh, V.**, Lakatos, G., Mészáros, I., 2006: Carotenoid composition and photochemical activity of four sandy grassland species. Photosynthetica, 44: 255-261. IF: 0,782

Mészáros, I., Veres, Sz., Kanalas, P., **Oláh, V.**, Szöllősi, E., Sárvári, É., Lévai, L., Lakatos, Gy. 2007: Leaf growth and photosynthetic performance of two co-existing oak species in contrasting growing seasons. *Acta Sylvatica et Lignaria Hungarica*, 3: 7-20.

Czudar, A., Górn, D., Varga, É., **Oláh, V.**, 2008: Role of vegetation in the functioning of a constructed wetland for wastewater treatment. *Cereal Research Communications*, 36: 1127-1130. IF: 1,190 (2007)

Kanalas, P., Szöllősi, E., **Oláh, V.**, Borovics, A., Mészáros, I. 2008: Small-scale variability in phenological, leaf morphological properties and isoenzyme pattern of sessile oak complex (*Lepidobalanus* sub-genus) in a sessile oak-Turkey oak forest stand. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 221-223.

Kanalas, P., Borovics, A., Cseke, K., Szöllősi, E., **Oláh, V.**, Fenyvesi, A., Mészáros, I. 2008: Taxonómiai, populációgenetikai és fenológiai vizsgálatok egy síkfőkúti erdő fehér tölgyeinek körében. *Természetvédelmi Közlemények*, (megjelenés alatt)

Mészáros, I., Veres, Sz., Szöllősi, E., Koncz, P., Kanalas, P., **Oláh, V.** 2008: Responses of some ecophysiological traits of sessile oak (*Quercus petraea*) to drought stress and heat wave in growing season of 2003. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 107-109.

Szöllősi, E., Veres, Sz., Kanalas, P., **Oláh, V.**, Solti, Á., Sárvári, É., Mészáros, I. 2008: Effects of UV-B radiation and water stress on chlorophyll fluorescence parameters and activity of xanthophyll cycle in leaves of sessile oak (*Quercus petraea*) seedlings. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 241-242.

Varga, É., Czudar, A., **Oláh, V.**, Gyulai, I. 2008: Changes of vegetation on the stony shore of lake Balaton under the influence of fluctuating water level. *Cereal Research Communications*, 36: 1123-1126. IF: 1,190 (2007)

Láposi, R., Veres, Sz., Lakatos, Gy., **Oláh, V.**, Fieldsend, A., Mészáros, I. 2009: Responses of leaf traits of European beech (*Fagus sylvatica* L.) samplings to supplemental UV-B radiation and UV-B exclusion. *Agricultural and Forest Meteorology*, 149: 745-755. IF: 3.668 (2008)

5. Egyéb konferencia kiadványokban megjelent teljes közlemények jegyzéke

Mészáros, I., Koncz, P., Kanals, P., Veres, Sz., Sárvári, É., **Oláh, V.**, Szöllősi, E., 2006: A kocsánytalan tölgy és a csertölgy ökofiziológiai sajátosságai kontrasztos időjárású években. In: Mátyás, Cs., Víg, P., (eds.) *Erdő és Klíma V.* pp. 183-197. ISBN 978-963-9364-88-2

6. Angol nyelvű konferencia előadások, poszterek jegyzéke

Oláh, V., Veres, Sz., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2005: Applicability of *in vivo* chlorophyll fluorescence induction method to detect the effects of trace pollutants on aquatic plants. 5th International Symposium on the ecology and management of Shallow Lakes. 5-9 June 2005, Dalfsen, Hollandia,. Book of Abstracts, p. 48. (előadás)

Mészáros, I., Veres, Sz., Koncz, P., **Oláh, V.,** Sárvári, É., Lévai, L., Szöllősi, E., Lakatos, G. 2006: Leaf growth, photochemical efficiency and pigment composition in sun and shade canopy layers of co-existing *Quercus petraea* L. and *Quercus cerris* L. trees during contrasting growing seasons. XV FESPB Congress, Lyon, 17-21 July 2006, Book of Abstracts, p. 90. (poszterbemutató)

Mészáros, I., Láposi, R., Veres, Sz., Sárvári, É., **Oláh, V.,** Lakatos, G. 2006: Physiological responses of sessile oak and pedunculate oak to supplemental UV-B radiation. 3rd EPSO Conference: Plant Dynamics: from molecules to ecosystems. 28 May – 1 June 2006, Visegrád, Hungary, p.116. (poszterbemutató)

Oláh, V., Szöllősi, E., Varga, É., Kiss, T., 2008: Chromium (VI) induced inhibition of photosynthesis and growth in duckweed. 7th Alps-Adria Scientific Workshop, 28 April – 1 May 2008, Stará-Lesná, Szlovákia (előadás)

Oláh, V., Combi, Zs., Szöllősi, E., Kanalas, P., Mészáros I., 2009: Anthocyanins: possible antioxidants against Cr (VI) induced oxidative stress in *Spirodela polyrrhiza*. 8th Alps-Adria Scientific Workshop, 27 April – 2 May 2008, Neum, Bosnia-Hercegovina (előadás)

7. Magyar nyelvű konferencia előadások, poszterek jegyzéke

Oláh, V., Gáspár, A., Láposi, R., Cseke, G., Veres, Sz., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2002: A klorofill-fluoreszcencia indukció módszer alkalmazása Lemna-tesztekben vízszennyezések ökotoxikológiai hatásainak tanulmányozására. XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2002. október 2-4. (poszterbemutató)

Oláh, V., Hörcsik, T.Zs., Cseke, G., Láposi, R., Veres, Sz., Gáspár, A., Lakatos, Gy. Mészáros, I. 2003: A Cr (VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* és a *Lemna gibba* L. növekedésére és fotoszintetikus aktivitására. XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3. (poszterbemutató)

Oláh, V., Cseke, G., Veres, Sz., Gáspár, A., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2003: Cd, Cr (VI), és glifozát hatása a növekedési és klorofill fluoreszcencia paraméterekre békalencse-tesztekben. V. Magyarországi Fotoszintézis Konferencia, Noszvaj. Program- és Összefoglaló kötet P. 9. (poszterbemutató)

Hörcsik, T.Zs., Szalay, G., Pál, M., **Oláh, V.,** Mészáros, I., Lakatos, Gy., Balogh Á. 2003: Fitokelatinok előfordulása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) stressz hatására. XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3. (poszterbemutató)

Oláh, V., Cseke, G., Hörcsik, T.Zs., Veres, Sz. és Mészáros, I. 2004: A króm (VI) hatásának vizsgálata békalencse-tesztekben a klorofill fluoreszcencia indukció paraméterek alapján. XLVI. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2004. október 6-8. (poszterbemutató)

Oláh, V., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2005: Békalencse-fajok krómérzékenysége. A „Magyar Tudomány Napja” alkalmából megrendezett TTK Biológiai Tanszékcsoport tudományos ülése, Debrecen, 2005. október 16. (előadás)

Oláh, V., Cseke, G., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2005: A króm(VI) hatása különböző békalencse-fajok tenyészeinek növekedésére. Magyar Hidrológiai Társaság XXIII. Országos Vándorgyűlése, Nyíregyháza, Konferenciakiadvány (CD) 3/b/7: 1-6. (előadás)

Oláh, V., Kiss, T., Zádori, J., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2006: Adatok hazai békalencse-fajok króm (VI)-érzékenységéhez. XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6. (poszterbemutató)

Koncz, P., Gáspár, A., **Oláh, V.,** Elek, L., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2006: Gyapjaslepke (*Lymantria dispar*) dominanciájú gradáció hatása cseres-tölgyes erdő lombkorona-szintjében a síkfőkúti ILTER területen. In: Szentesi, Á., Szövényi, G., Török, J. (szerk.): 7. Magyar Ökológus Kongresszus, Budapest, 2006. szeptember 4-6., Előadások és poszterek összefoglalói. p. 110. (poszterbemutató)

Mészáros, I., Láposi, R., Veres, Sz., **Oláh, V.,** Koncz, P., Szöllősi, E., Lakatos, Gy. 2006: UV-B sugárzás hatása a kocsánytalan és a kocsányos tölgy leveleinek fotoszintetikus aktivitására és flavonoid tartalmára. V. Erdő és klíma konferencia, Mátrafüred, 2006. október 25-27. (poszterbemutató)

Veres, Sz., Láposi, R., **Oláh, V.,** Lévai, L., Koncz, P., Szöllősi, E., Mészáros, I. 2006: Eltérő bükk származások összehasonlító ökofiziológiai jellemzése. V. Erdő és klíma konferencia, Mátrafüred, 2006. október 25-27. (poszterbemutató)

Zádori, J., **Oláh, V.**, Kiss, T., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2006: A *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden króm (VI)-érzékenységeinek változása eltérő szulfát-koncentrációjú tápközegekben. XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6. (poszterbemutató)

Oláh, V., Kiss, T., Tóth, Gy.D., Surányi, Gy., Szöllősi, E., Mészáros, I. 2007: Bojtos békalencse (*Spirodela polyrrhiza*) ökotípusok króm (VI)-toleranciájának vizsgálata. XLIX. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2007. október 3-5. (poszterbemutató)

Oláh, V., Szöllősi, E., Kiss, T., Szabó, Sz., Lakatos, Gy., Mészáros, I. 2008: Az antocián-felhalmozódás, mint lehetséges biomarker *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden tenyészetekben. XLIX. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2008. október 1-3. (poszterbemutató)

Oláh, V., Tóth, Gy.D., Szöllősi, E., Kiss, T., 2008: Comparative study on sensitivity of different physiological properties of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden to Cr (VI) treatments. Magyar Növénybiológiai Társaság IX. Kongresszusa, Szeged, 2008. július 7-9. (poszterbemutató)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Mészáros Ilonának, illetve Dr. Lakatos Gyulának, akiknek mindenre kiterjedő segítsége és támogatása nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm a Növényi Ökofiziológia Kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak, szakdolgozóinak: Combi Zsoltnak, Cseke Georginának, Galamb Zsuzsának, Gáspár Angélának, Hörsik Zsoltnak, Kanalas Péternek, Keresztes Évának, Kiss Tibornak, Kovács Juditnak, Dr. Láposi Rékának, Simon Zoltánnak, Szabó Katalinnak, Szöllősi Erzsébetnek, Tóth Györgynek, Zádori Józsefnek, Koncz Péternek, Elek Lászlónak, Dr. Veres Szilviának a munkám során nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom a DE TTK Növénytani Tanszék volt és jelenlegi dolgozóinak, hogy segítségükkel, illetve önzetlen alkalmazkodásukkal, kellemes légkörrel segítették a munkámat.

Hálásan köszönöm párom illetve családom, barátaim biztatását, türelmét, megértését, amelyet irányomban tanúsítottak.