



Beneficial or toxic effects of soot on the plants - model research

Monika BOJKO^{1*}, Katarzyna LENART¹, Edyta WARKIEWICZ¹, Barbara KALICKA¹, Marek CHYC²,
Monika OLCHAWA-PAJOR¹, Dariusz LATOWSKI¹

¹ Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, adres: ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, Polska, tel.: +48 12 6646368, fax : +48 12 6646902, e-mail: M.Bojko@uj.edu.pl, k.lenart@uj.edu.pl, edyta.warkiewicz@uj.edu.pl, barbarakalicka@wp.pl, olchawa.pajor@gmail.com, dariuszlatowski@gmail.com

² Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Tarnowie, ul. Mickiewicza 8, 33-100 Tarnów, e-mail mrsch@tlen.pl

Abstract

The aim of the study was investigated the effect of selected types of soot on *Arabidopsis thaliana* in vitro culture. In experiments different type the soot were used: (1) formed in the presence of a commercial fuel additive containing significant quantities of sodium chloride and copper(II) sulfate(VI) (2) prepared by adding of the newly developed additive without NaCl and with triiron tetraoxide instead of copper and (3) prepared without additive. The soot were added to the culture media (to the root) or applied on the leaves. The parameters such as root length, fresh weight, photosynthetic efficiency (Fv / Fm), the concentration of photosynthetic pigments, index of tolerance (IT) were analyzed. The fresh weights of the investigated plants were comparable or slightly lower than the fresh weights of control plants. The values of the photosynthetic efficiency were comparable to the control when the soot were added to culture medium (to the root) or slightly lower when were applied on the leaves. However, content of photosynthetic pigments were higher than in control plants. The highest indexes of tolerance (even above 100%) were observed for plants growing on media containing the soot formed in the presence of additive with iron.

Keywords: fuel additive, soot, index of tolerance, Fv/Fm, *A. thaliana*

Streszczenie

Korzystny czy szkodliwy wpływ sadzy na rośliny – badania modelowe

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych rodzajów sadzy na *Arabidopsis thaliana* w hodowlach in vitro. Stosowano sadzę powstałą: (1) w obecności komercyjnego dodatku paliwowego zawierającego chlorek sodu i siarczan(VI) miedzi(II), (2) dodatku nowo opracowanego zawierającego tetratlenek tróźelaza i (3) bez dodatku. Sadze dodawano do pożywek hodowlanych (dokorzeniowo) lub наносzono na blaszki liściowe (dolistnie) i analizowano parametry takie jak: długość korzenia, świeża masa, wydajność kwantowa fotosyntezy (Fv/Fm), stężenie barwników fotosyntetycznych, indeks tolerancji (IT). Świeża masa roślin była porównywalna lub nieco niższa niż roślin kontrolnych. Wartości wydajności kwantowej fotosyntezy były porównywalne z kontrolą gdy sadza była podawana dokorzeniowo lub nieco niższe, gdy stosowano ją dolistnie. Zawartość barwników fotosyntetycznych była wyższa niż w roślinach kontrolnych. Najwyższy indeks tolerancji (nawet powyżej 100%) charakteryzował rośliny rosnące na podłożach z dodatkiem sadzy powstałej w obecności katalizatora zawierającego żelazo.

Słowa kluczowe: dodatki paliwowe, sadza, indeks tolerancji, Fv/Fm, *A. thaliana*

1. Wstęp

Powszechne spalanie paliw kopalnych, prócz oczywistej korzyści, jaką jest pozyskanie energii, niesie za sobą również poważne zagrożenia. Mowa tutaj o emisji do atmosfery substancji takich jak tlenki azotu, tlenki węgla, ditlenek siarki, czy pyły [1]. Wśród zanieczyszczeń pyłowych szczególną uwagę należy poświęcić sadzy.

Sadza stanowi produkt uboczny procesu niecałkowitego spalania paliw. W skład sadzy wchodzi związek organiczne (m. in. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, fenole, parafiny, dioksyne), oraz

nieorganiczne (m. in. amorficzna postać węgla, fulereny, metale i ich związki) [2]. Należy podkreślić, iż skład sadzy zależy od rodzaju spalanej paliwa (a więc od jego składu chemicznego), jak również od warunków, w których proces jest prowadzony (temperatura, dostęp powietrza i katalizatory) [2]. Wśród głównych źródeł emisji sadzy do środowiska wyróżnia się emitery wykorzystujące spalanie węgla (kotłownie, ciepłownie), transport samochodowy (użytkowanie samochodów z silnikiem Diesla), a także wypalanie terenów zielonych.

Ze względu na swój skład (zwłaszcza metale ciężkie i związki organiczne) oraz niewielkie rozmiary cząstek, sadza stanowi zagrożenie zarówno dla środowiska, jak i samego zdrowia i życia człowieka. Mała gęstość nasypowa sadzy pozwala jej na utrzymywanie się w atmosferze przez długi czas [3], skąd może w wyniku depozycji przedostawać się do wód i gleby zmieniając ich jakość i skład. Badania dowodzą również, że sadza wpływa istotnie na zmiany klimatyczne – to właśnie depozycji sadzy na lodowcach i pokrywach śnieżnych przypisuje się wzrost szybkości ich topnienia (sadza zmniejsza ich albedo jednocześnie absorbując promieniowanie słoneczne) [4].

Badania wskazują, iż jako składnik pyłów PM₁₀ i PM_{2,5}, sadza może negatywnie oddziaływać na człowieka wywołując schorzenia dróg oddechowych [5,6], a nawet zmiany mutagenne i kancerogenne [3]. Ze względu na postępujące zanieczyszczenie powietrza na obszarach zamieszkałych przez człowieka, badania wpływu sadzy na zdrowie człowieka przeważają nad badaniami wpływu tego czynnika na pozostałe elementy środowiska. Niewiele jest również prac naukowych traktujących o wpływie sadzy na mikroorganizmy czy wzrost i rozwój roślin.

Omówione poniżej dane przedstawiają sadzę jako produkt uboczny szczególnie niepożądany. W celu ograniczenia produkcji sadzy (a więc ułatwieniu całkowitego spalania paliw) stosuje się dodatki paliwowe zwane katalizatorami. Obecnie na rynku dostępne są katalizatory, których skład oparty jest o azotany sodu i potasu, chlorek sodu czy sole miedzi [7]. Badania wykazały, iż zawarte w katalizatorach związki miedzi mogą przyczynić się do powstawania toksycznych ksenobiotyków, natomiast chlorek sodu może być źródłem chloru i chlorowodoru [7]. Dowodzi to, że katalizator ogranicza produkcję sadzy, w dalszym ciągu będąc nieekologicznym i mogącym mieć niepożądany wpływ na rośliny, zwierzęta i ludzi.

Przedstawione w niniejszej pracy badania dotyczą porównania wpływu sadzy uzyskanej poprzez spalanie określonej ilości węgla z nowo opracowanym dodatkiem paliwowym zawierającym tetratlenek trizelaza jako składnik aktywny katalitycznie, sadzy powstałej w obecności powszechnie stosowanego i dostępnego w handlu dodatku paliwowego bogatego w chlorek sodu i siarczan(VI) miedzi(II) oraz sadzy niemodyfikowanej powstałej przez spalanie takiej samej ilości węgla bez dodatku katalizatorów, na morfologię (długość korzenia) i świeżą masę roślin w hodowlach *in vitro*. Opierając się na uzyskanych wynikach przeprowadzonych eksperymentów obliczono indeksy tolerancji (IT) roślin na składniki sadzy. Dodatkowo zbadano wpływ sadz modyfikowanych i niemodyfikowanych na wybrane parametry fizjologiczne roślin związane z najważniejszym procesem roślinnym, tj. fotosyntezą. Badano wpływ sadzy na wydajność kwantową fotosyntezy (Fv/Fm) i obecność barwników niezbędnych do przebiegu tego procesu czyli chlorofilu a (Chl a), chlorofilu b (Chl b) i karotenoidów (kar).

Doświadczenia przeprowadzono na *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity) WT Columbia, roślinie jednorocznej z rodziny kapustowatych (Brassicaceae) [8] jednej z najczęściej wybieranych jako obiekt badań związanych z biochemią, genetyką i fizjologią roślin [9]. Pewne cechy, takie jak zsekwencjonowany genom [9,10], łatwość utrzymania czystych linii [11], znane mapy genetyczne wszystkich pięciu par chromosomów [10] pozwoliły na nadanie jej statusu rośliny modelowej, co obok łatwej i niewymagającej hodowli, a także krótkiego (6 tygodni) cyklu rozwojowego [10], zdecydowało o wybraniu rzodkiewnika na materiał roślinny do niniejszych badań.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał badawczy

W doświadczeniach wykorzystano trzy rodzaje sadzy, które powstały w wyniku spalania 10 kg węgla kamiennego pochodzącego z KWK Piast w Bieruniu o wartości opałowej 22,4 MJ/kg sortu orzech z dodatkiem różnych katalizatorów: sadza oznaczana jako sadza z Fe powstała w obecności nowo opracowanego dodatku paliwowego do paliw stałych, którego cechą charakterystyczną jest brak chlorku sodu, a katalizator w postaci soli miedzi, typowy w wielu komercyjnych dodatkach paliwowych został zastąpiony tetratlenkiem trizelaza (50% wag.); sadza oznaczona jako sadza z Cu powstała poprzez spalanie węgla w obecności powszechnie stosowanego dodatku, w którego skład wchodzi głównie $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (38-42% wag.) i NaCl (40-44% wag.); sadza oznaczona

jako NM czyli niemodyfikowana powstała poprzez spalanie węgla bez dodatków paliwowych. Sadze uzyskiwano poprzez spalanie węgla w tym samym kotle, aby zapewnić porównywalne warunki spalania. Pomiędzy eksperymentami kocioł czyszczono i przepalano minimum 5 razy w celu zminimalizowania prawdopodobieństwa wpływu pozostałości innego dodatku paliwowego.

2.2. Hodowla roślin.

Tekst *A. thaliana* Columbia wildtype 0 (nasiona uzyskane w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin z nasion pochodzących z *Arabidopsis Biological Resource Center* (Ohio State University, USA) hodowano na pożywce Gamborg B5 (sole mineralne i witaminy; Duchefa Biochemie) zestalonej 1,2% agarom. Standardowa pożywka stanowiła próbę kontrolną. Pożywkę z sadzą przygotowywano identycznie jak pożywkę kontrolną dodając przed sterylizacją odpowiednią naważkę homogennej sadzy (sadzy z Fe, sadzy z Cu lub sadzy NM), która stanowiła 2,5 lub 5% v/v objętości pożywki (0,15 lub 0,3 g na 40ml pożywki). Po sterylizacji w autoklawie pożywki wylewano na szalki Petriego (do pełna) i po zestaleniu połowę wycinano (w poprzek szalki) lub pozostawiano w słoikach. Na tak otrzymaną powierzchnię nanoszono wysterylizowane nasiona *A. thaliana* [12]. *A. thaliana* hodowano również na szalkach Petriego w sposób typowy (pożywka wylana do wysokości ok. 1 cm). Nasiona kiełkowano przez 2 tygodnie na szlakach a potem pasażowano na pożywkę w słoikach hodowlanych i hodowano przez 6 tygodni. Sterylizację nasion przeprowadzano poprzez inkubację nasion w 70% v/v etanolu (1 min) a następnie w 10 % v/v podchlorynie sodu (7 min). Po końcowym odmyciu czynników sterylizujących poprzez przemywanie i usuwanie sterylnej destylowanej wody, nasiona przenoszono na podłoża (zmodyfikowana metoda Maysubayashi i Sakagami 1996). Rośliny hodowano w termostatowanych pomieszczeniach hodowlanych w 20°C, stosując fotoperiod 14 godzin światła 10 godzin ciemności. Natężenie światła w pomieszczeniu wynosiło ok 60 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Eksperyment powtórzono cztery razy.

A. thaliana hodowano również na korkach torfowych do hodowli roślin. Rośliny hodowano w komorze hodowlanej w temperaturze ok 20°C, wilgotności względnej 60% i fotoperiodzie 14:10 światło : ciemność jak w przypadku hodowli na podłożu agarowym. Hodowle prowadzono przez 6 tygodni. Po pierwszych 4 tygodniach rośliny podzielono na grupę kontrolną i 3 grupy przeznaczone do podania odpowiedniej sadzy (dolistnie). Rośliny wyznaczone do prób z sadzą posypano każdą 60 mg odpowiedniej sadzy (sadzy z Fe, sadza z Cu i sadza NM). W czasie 2 tygodniowego drugiego etapu eksperymentu podłoża (korki torfowe) utrzymywano w odpowiednim dla *A. thaliana* stopniu nawodnienia. Eksperyment powtórzono dwa razy.

2.3. Wyznaczanie indeksów tolerancji.

Wyznaczano indeks tolerancji na podstawie długości korzenia (dla siewek do 14 dnia wzrostu) i na podstawie świeżej masy roślin starszych (od drugiego do ósmego tygodnia hodowli).

W celu umożliwienia swobodnego wzrostu korzenia rośliny hodowano na pożywce agarowej w pozycji pionowej. Pomiaru długości korzenia dokonywano w czwartym, siódmym, dziewiątym i trzynastym dniu hodowli roślin. Rośliny wyjmowano z podłoża, oczyszczano z agaru i dokonywano pomiaru ich długości pod lupą (Prolab Q02-3590) z dokładnością do 0,5 mm. Równolegle przygotowywano dokumentację fotograficzną. Indeks tolerancji obliczano dla dwóch różnych stężeń stosowanych sadz dla każdego dnia, w którym dokonywano pomiarów, według wzoru [12, 13, 14]:

$$ITA = \frac{\text{długość korzenia rośliny na podłożu z sadzą} \times 100\%}{\text{długość korzenia rośliny na podłożu kontrolnym}} \quad (2.3.1.)$$

Indeks tolerancji dla roślin starszych obliczano na podstawie świeżych mas roślin hodowanych w specjalnych słoikach hodowlanych w identycznych warunkach jak rośliny w doświadczeniach, w których dokonywano pomiaru korzenia. Części nadziemne roślin oczyszczone z agaru ważono z dokładnością do 0,5 mg. Indeks tolerancji obliczano ze wzoru [15]:

$$ITB = \frac{\text{ś.m.rośliny na podłożu z sadzą} \times 100\%}{\text{ś.m.rośliny na podłożu kontrolnym}} \quad (2.3.2.)$$

2.4. Pomiar maksymalnej wydajności kwantowej fotosyntezy.

Do pomiarów maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II stosowano fluorometr PAM-210 (Walz,

Niemcy). Do pomiarów pobierano całe rośliny (hodowle na podłożu zestalonym agarem), lub losowo pobrane liście (doświadczenie z roślinami hodowanymi na korkach torfowych, jeżeli sadza była podawana dolistnie sadzę splukiwano a liść delikatnie osuszano), zaciemniano przez 15 min, a następnie liście umieszczano w pojedynczej warstwie na powierzchni światłowodu miernika. Pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach według standardowych procedur przyrządu [12, 16].

2.5. Oznaczanie stężenie chlorofili i karotenoidów

Pomiarów zawartości barwników fotosyntetycznych w liściach *A. thaliana* dokonywano bezpośrednio po pomiarach wydajności kwantowej fotosystemu II i pomiarach świeżej masy. Losowo wybrane liście ważono i ucierano w obecności ciekłego azotu w probówkach Eppendorfa. Utartą tkankę zadawano 80% v/v wychłodzonym acetonem i wirowano. W uzyskanym ekstrakcie mierzono absorbancję przy następujących długościach fal: 662 nm (A_{662}), 645 nm (A_{645}) i 470 nm (A_{470}) względem 80% v/v acetonu jako próby ślepej na spektrofotometrze JascoV-650. Stężenie barwników obliczano według metody Lichtenthalera [17].

$$C_{Chl a} = 11,75 \times A_{662} - 2,35 \times A_{645} [\mu\text{g/ml}] \quad (2.5.1.)$$

$$C_{Chl b} = 18,61 \times A_{645} - 3,96 \times A_{662} [\mu\text{g/ml}] \quad (2.5.2.)$$

$$C_{kar} = (1000 \times A_{470} - 2,27 \times C_{Chl a} - 81,4 \times C_{Chl b})/227 [\mu\text{g/ml}] \quad (2.5.3.)$$

2.6. Opracowanie statystyczne wyników

Do opracowania statystycznego wyników wykorzystano program Statistica, w którym wykonano analizę ANOVA (test Scheffego).

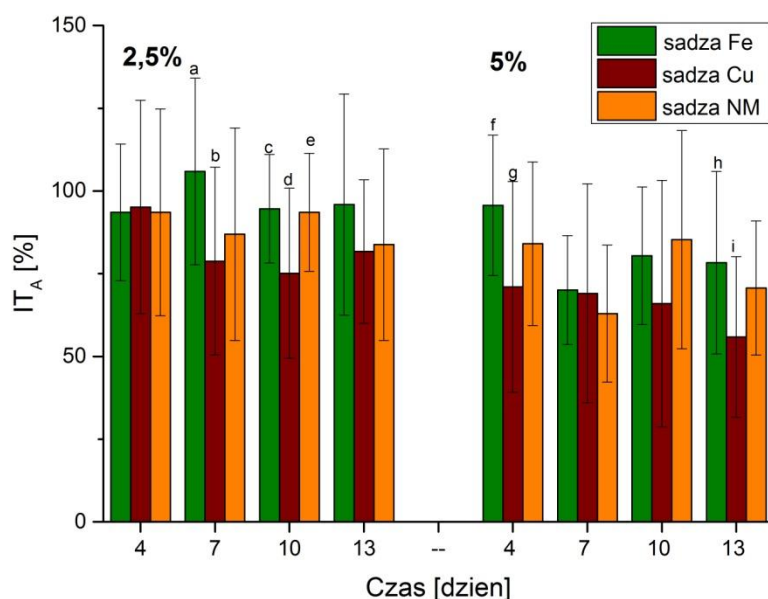
3. Wyniki i dyskusja

Do jednych z głównych zanieczyszczeń środowiska a szczególnie atmosfery i gleby należą zanieczyszczenia powstałe wskutek działania przemysłu energetycznego i indywidualnego ogrzewania mieszkań i wody. Jednym z produktów ubocznych spalania paliw stałych jest sadza, która może być przyczyną poważnych zmian chemicznych i biologicznych w atmosferze i w środowisku glebowym [18]. W skutek depozycji sadzy do gleby dostają się duże ilości metali ciężkich (dla przebadanej przykładowej sadzy 790 mg/kg sadzy) i związków organicznych. Skład chemiczny powstającej sadzy jest zróżnicowany jakościowo i ilościowo i zależy od składu chemicznego paliwa, warunków termodynamicznych procesu spalania, rodzaju paleniska i może być modyfikowany przez dodatki paliwowe [7, 19]. Producenci dodatków paliwowych starają się tak dobrać odpowiednie związki, by w jak największym stopniu obniżyć toksyczne działanie sadzy na środowisko i ponownie wykorzystają powstały odpad [20].

Przeprowadzone eksperymenty miały na celu zbadanie wpływu wybranych sadz powstałych w obecności dodatków paliwowych: nowo opracowanego wzbogaconego w żelazo (sadza Fe), powszechnie stosowanego, który zawiera NaCl i sole miedzi (sadza Cu) i sadzy niemodyfikowanej (sadza NM) na wybrane parametry związane ze wzrostem i rozwojem roślin i parametry określające tolerancję roślin na złożony skład sadz.

Przez dwa tygodnie obserwowano zmiany długości korzenia w hodowlach pionowych i stwierdzono, że korzenie *A. thaliana* rosnących na podłożu agarowym w obecności sadzy z Fe, sadzy z Cu i NM o stężeniu 2,5% v/v były dłuższe od korzeni roślin rosnących z dodatkiem sadz o stężeniu 5% v/v. Na podstawie zmierzonych długości obliczono indeks tolerancji (IT_A) (Rys. 3.1). Stwierdzono, że indeksy obliczone dla kolejnych dni hodowli z 2,5% v/v sadzy nie zmieniają się, natomiast w obecności 5% v/v mają nieznaczną tendencję spadkową wraz z długością ekspozycji. Otrzymane wartości indeksów są obdarzone stosunkowo wysokimi odchyleniami standardowymi wynikającymi z małych rozmiarów siewek i dużymi różnicami pomiędzy siewkami (Rys. 3.2). IT_A dla wyższych stężeń sadz jest niższy i przyjmuje różne wartości w zależności od podawanej dokożeniowo sadzy. Najwyższe wartości IT_A otrzymano dla siewek rosnących na podłożu z sadzą z Fe i wahały się one od 105% do 70%, a najniższe dla sadzy z Cu od 95% do 55% w zależności od stężenia sadzy i czasu ekspozycji (Rys. 3.1).

Porównano również masy części nadziemnych roślin i ich indeksy tolerancji IT_B w 2-, 4- i 8-tygodniu hodowli (hodowle na podłożu agarowym, sadza podawana dokożeniowo) (Rys. 3.3). Zaobserwowano, że rośliny hodowane na podłożu z sadzą z Fe osiągały porównywalne z kontrolą (pożywka bez sadzy) lub wyższe masy części nadziemnej, charakteryzowały się zwartym pokrojem i największymi blaszkami liściowymi (Rys. 3.4).

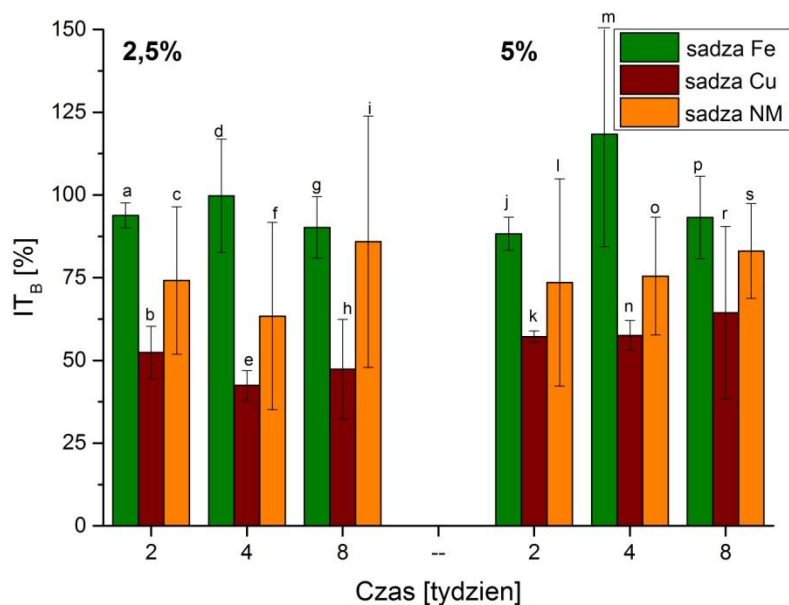


Rysunek. 3.1 Porównanie wartości IT_A *A. thaliana* na obecność sadzy z Fe (sadza powstała w obecności dodatku paliwowego z żelazem, sadzy z Cu (sadza powstała w obecności dodatku paliwowego z NaCl i miedzą) i sadzy NM (niemodyfikowanej, powstałej bez dodatków paliwowych) o stężeniu 2,5% v/v (lewa strona wykresu) i 5% v/v (prawa strona wykresu) w pożywce. Indeks policzono dla roślin 4-, 7-, 10- i 13-dniowych. $p < 0,05$ różnice statystycznie istotne pomiędzy wynikami oznaczonymi na wykresie jako ab, cd, de, fg, hi w poszczególnych grupach (test Scheffego).



Rysunek. 3.2 *A. thaliana* w 10-dniu hodowli, po usunięciu podłoża zestalonego agarem w obecności sadzy (od lewej): NM, sadzy z Cu, sadzy z Fe i z hodowli w warunkach kontrolnych. Białe prostokąty stanowią skalę o długości 1cm. Szczegóły patrz rysunek 3.1.

Nie zaobserwowano również znacznych różnic pomiędzy osobnikami o tym samym wieku rosnącymi na podłożach z różnymi stężeniami sadzy Fe (Rys. 3.5). Oznaczone IT_B podobnie jak IT_A osiągały najwyższe wartości dla roślin hodowanych w obecności sadzy z Fe i przyjmowały wartości od nawet 118% w 4-tygodniu w obecności 5% v/v do 90% w 8-tygodniu hodowli. Niższe wartości indeksu stwierdzono dla roślin rosnących w obecności sadzy NM, a najniższe, nawet o 60%, w obecności sadzy z Cu (4-tydzień 2,5% v/v) w stosunku do IT_B w obecności sadzy z Fe.

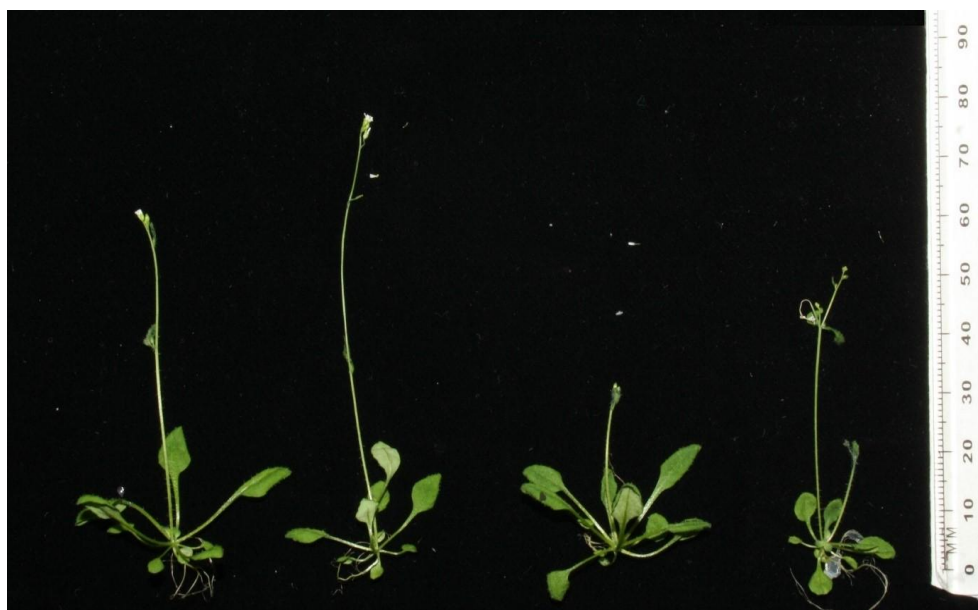


Rysunek. 3.3 Porównanie wartości IT_B *A. thaliana* na obecność sadzy z Fe (sadza powstała w obecności dodatku paliwowego z żelazem, sadzy z Cu (sadza powstała w obecności dodatku paliwowego z NaCl i miedzią) i sadzy NM (niemodyfikowanej, powstałej bez dodatków paliwowych) o stężeniu 2,5% v/v (lewa strona wykresu) i 5% v/v (prawa strona wykresu) w pożywce. Indeks policzono dla roślin 2, 4 i 8 tygodniowych. . $p < 0,05$ różnice statystycznie istotne pomiędzy wynikami oznaczonymi na wykresie jako ab, ac, de, ef, df, gh, hi, jk, jl, mn, no, mo, pr, ps w poszczególnych grupach (test Scheffego).

Różnice w wartościach indeksów tolerancji IT_A szczególnie wyraźne dla IT_B sugerują, że skład chemiczny sadz stosowanych do doświadczeń różni się i wpływa na części podziemne i nadziemne roślin. Każda pożywka zawierała podstawowe i powszechnie stosowane do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin stężenia makro-, mikroelementów i witamin. Suplementowanie pożywek sadzami, które powstały w obecności różnych dodatków paliwowych wpłynęło na powstanie różnic w długości korzenia (organ mający jako pierwszy kontakt z podawaną dokorzeniowo sadzą) i masą części nadziemnej badanych roślin. Sadze na pewno zawierały różne stężenia metali ciężkich, które w różny sposób mogą wpływać na rośliny [21] a dodatkowo różniły się zawartością miedzi z powodu wysokich stężeń tego pierwiastka w dodatku paliwowym w sadzy z Cu. Miedź jest nie tylko metalem ciężkim, ale również mikroelementem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Niedobór tego pierwiastka może wywoływać tak zwane objawy niedoboru, a małe dawki mogą stymulować kiełkowanie nasion, wzrost korzeni, pędów i liści jak również przyrost biomasy, podczas gdy wyższe dawki mogą hamować szybkość wzrostu części nadziemnych i korzeni, powodować zmniejszenie biomasy roślin a nawet śmierć siewek [12, 22, 23]. Zmiany wywołane zbyt wysokim stężeniem miedzi w pożywkach z sadzą z Cu zaobserwowano u roślin w prezentowanych eksperymentach. Równoczesna obecność innych metali ciężkich może również modulować wywoływane zmiany przez inne składniki sadz w pożywce np. znoszenie działania kadmu jako inhibitora przez obecność cynku [24].



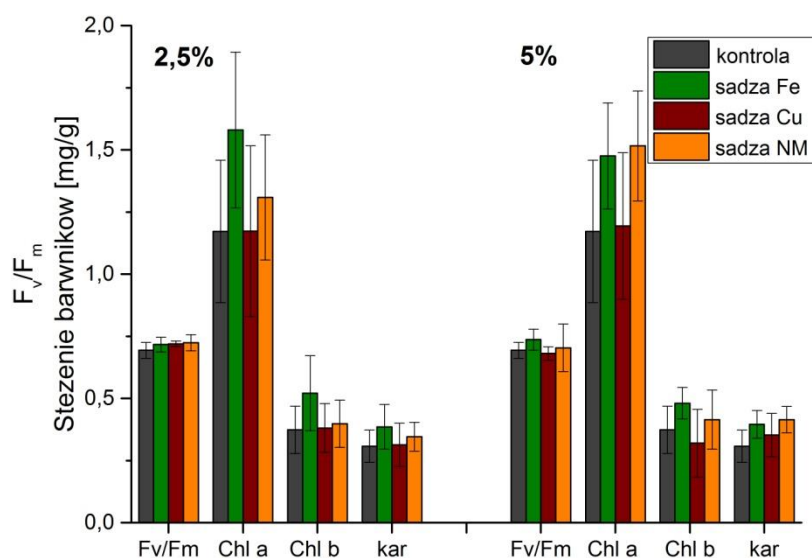
Rysunek. 3.4 *A. thaliana* w 4 tygodniu hodowli, na podłożu zestalonym agarem w obecności (od lewej) 5% v/v sadzy NM, sadzy z Cu, sadzy z Fe i z hodowli w warunkach kontrolnych. Szczegóły patrz rysunek 3.3.



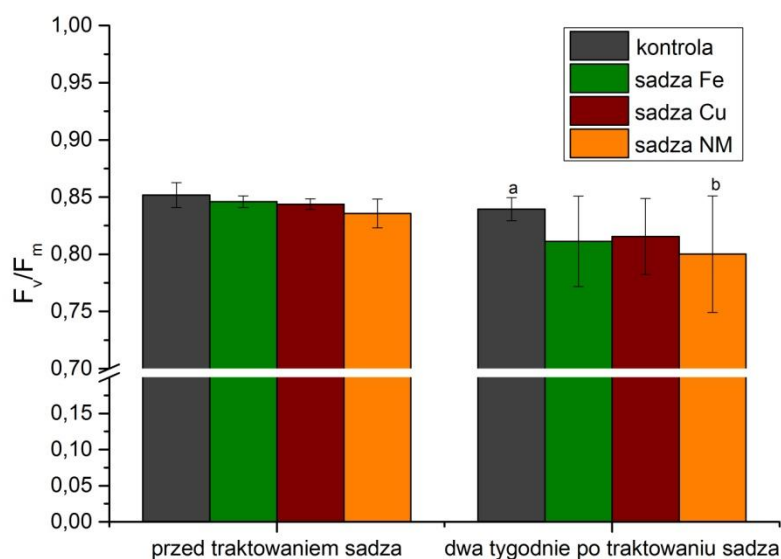
Rysunek. 3.5 *A. thaliana* w 4-tygodniu hodowli, na podłożu zestalonym agarem w obecności sadzy z Fe (od lewej) 5, 2,5 i 1,25% v/v i hodowli w warunkach kontrolnych. Szczegóły patrz rysunek 3.3.

Ponieważ fotosynteza jest najważniejszym procesem w fizjologii roślin, czułym na działanie wielu metali ciężkich na różnych etapach jej jasnej fazy jest ona często stosowana w celu ustalenia stanu fizjologicznego rośliny [16, 21]. W niniejszej pracy dokonano pomiarów wydajności kwantowej fotosyntezy i stężeń barwników fotosyntetycznych, roślin 8-tygodniowych, które rosły w warunkach kontrolnych i na pożywce agarowej suplementowanej sadzami (sadza podawana dokorzeniowo, Rys. 3.6) i na roślinach 6-tygodniowych, które rosły na korkach torfowych przez pierwsze 4 tygodnie bez ekspozycji na sadzę a potem zostały dolistnie potraktowane sadzą (sadza podana dolistnie) i po 2 tygodniach ekspozycji ponownie przebadane (Rys. 3.7). W pierwszym eksperymencie wyniki pomiarów wykazały nieznaczne różnice w wartościach F_v/F_m niezależnie od rodzaju

sadzy. Dla roślin z warunków kontrolnych wartość średnia wynosiła 0,694 a dla roślin eksponowanych na działanie sadzy od 0,717 (sadza z Fe) do 0,724 (sadza NM). Nie zaobserwowano również wyraźnych różnic w zabarwieniu liści pomiędzy roślinami kontrolnymi a roślinami rosnącymi na podłożach z sadzą mimo, że najczęściej wywoływanyymi przez metale ciężkie objawami są chlorozy, nekrozy, przebarwienia antocyjanami części nadziemnych a najczęściej liści [23]. Po zmierzeniu zawartości barwników fotosyntetycznych w tkankach roślinnych stwierdzono, że stężenia zarówno Chl a, Chl b i karotenoidów są wyższe w roślinach rosnących na pożywkach z sadzą z Fe i sadzą NM (niezależnie od stężenia sadzy) niż w roślinach kontrolnych. Natomiast stężenia barwników w roślinach rosnących z sadzą z Cu nie różniły się od kontroli. Próba analizy otrzymanych wyników i skorelowania ich z podwyższonym stężeniem miedzi przy równoczesnej obecności innych składników sadzy, w tym metali ciężkich w podłożu nie jest jednoznaczna. Podwyższone stężenia Cu mogą powodować zarówno obniżenie jak i podwyższenie zawartości chlorofili co może być powiązane z syntezą chlorofilu i zmianami transportowanego żelaza niezbędnego do tej syntezy, jak różnic w progu toksyczności badanego pierwiastka szczególnie gdy inne składowe pożywki obecne w różnych stężeniach również mogą modulować zawartość barwników [25, 26, 27]. Podwyższone stężenie karotenoidów można natomiast wiązać z niespecyficzną reakcją na stres oksydacyjny wywołany obecnością metali ciężkich [28, 29, 30].



Rysunek. 3.6 Maksymalna wydajność kwantowa fotosyntezy (F_v/F_m) i stężenia Chl a, Chl b i całkowite karotenoidów *A.thaliana* w 8 tygodniu hodowli na podłożu zestalonym agarem w obecności sadzy z Fe, sadzy z Cu, sadzy NM i w warunkach kontrolnych. Szczegóły patrz rysunek 3.3. Analiza wariancji (test Scheffego) nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami.



Rysunek. 3.7 Maksymalna wydajność kwantowa fotosyntezy (F_v/F_m) *A. thaliana* w 4-tygodniu hodowli (przed podaniem dolistnym sadzy) i dwa tygodnie po traktowaniu sadzą z Fe, sadzą Cu, sadzą NM i w warunkach kontrolnych, nadal bez sadzy (6 tydzień hodowli) hodowanych na korkach torfowych. Szczegóły patrz Materiały i Metody (2.2, 2.4). $p < 0,05$ różnice statystycznie istotne pomiędzy wynikami oznaczonymi na wykresie jako ab w grupie (test Scheffego).

W drugim doświadczeniu porównano wydajność kwantową fotosyntezy roślin przed podaniem dolistnym sadzy i tych samych roślin po dwutygodniowej obecności sadzy na liściach roślin. Stwierdzono, że parametr F_v/F_m w próbie kontrolnej przed i po eksperymencie nie zmienił się natomiast dla roślin, którym podano dolistnie sadze wartości F_v/F_m obniżyły się o 4,1, 3,5 i 4,3% (odpowiednio dla sadzy z Fe, sadzy z Cu i NM) w stosunku do wartości przed podaniem sadzy. Należy również zwrócić uwagę, że wartości F_v/F_m dla roślin rosnących w warunkach jałowych na pożywkach z agarem były niższe niż dla roślin rosnących na korkach torfowych (Rys. 3.6, 3.7). Zaobserwowane różnice pomiędzy roślinami, które miały podawane sadze dokorzeniowo a roślinami, którym podano sadze, wprawdzie na krótszy okres, ale dolistnie mogą być związane ze sposobem pobierania składników przez korzenie i blaszki liściowe a także z występowaniem lub brakiem barier, które ograniczają dostęp niekorzystnym związkom do ważnych metabolicznie komórek i tkanek [23]. Analizując wpływ składu sadzy ze szczególnym uwzględnieniem różnic w stężeniu Cu, związanym z obecnością tego pierwiastka w dodatku paliwowym, na parametr F_v/F_m należy podkreślić, że dane literaturowe podają przykłady, w których miedź w stężeniu do 50 μM nie wpływała na wydajność kwantową fotosyntezy. Wyraźne obniżenie wartości F_v/F_m obserwowano dopiero w obecności 1,6 mM Cu [21, 27]. Sugeruje to, że obserwowany niewielki spadek wartości F_v/F_m w obecności wszystkich rodzajów sadzy prawdopodobnie związany jest z różnorodnością jakościowego i ilościowego składu badanych sadz.

4. Podsumowanie

Sadza jest produktem ubocznym niepełnego spalania paliw, w skład której oprócz krystalicznego amorficznego węgla wchodzić związki szkodliwe: organiczne (na przykład benzen, ksylen, WWA) i składniki nieorganiczne (na przykład tlenki i sole metali ciężkich, wolna rtęć). W celu ułatwienia całkowitego spalania paliw stosuje się „katalizatory” (właściwie dodatki paliwowe), które zmniejszając ilość powstającej sadzy, mogą jednocześnie wpływać na wzrost zawartości toksycznych jej składników. Jako pyłowe zanieczyszczenie powietrza, sadza może przedostawać się do gleby na drodze depozycji i wpływać na żyjące w niej organizmy. Jednakże badanie wpływu

sadzy na organizmy wciąż nie doprowadziło do uzyskania jednoznacznych dowodów na temat wpływu zanieczyszczeń na biocenozę gleby.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pokazały, jaki wpływ na wybrane parametry morfologiczne i fizjologiczne *Arabidopsis thaliana* w hodowlach *in vitro* mogą mieć wybrane rodzaje sadzy: niemodyfikowana, sadza powstała w obecności dodatku paliwowego bogatego w NaCl oraz miedź i dodatku nowo opracowanego zawierającego żelazo. Sadze dodawano do pożywek hodowlanych (dokorzeniowo) oraz наносzono na blaszki liściowe (dolistnie). Stwierdzono, że rośliny rosnące na pożywkach suplementowanych sadzami osiągały porównywalne (sadza z Fe) lub mniejsze świeże masy (sadza NM, sadza z Cu) od świeżych mas roślin z warunków kontrolnych. Wartości wydajności kwantowej fotosyntezy były porównywalne (gdy sadze były podawane dokorzeniowo) lub nieco niższe (gdy były podawane dolistnie) od kontroli. W roślinach zmierzono wyższe zawartości barwników fotosyntetycznych, gdy w podłożu była sadza z Fe lub sadza niemodyfikowana lub podobne do kontroli gdy w podłożu była sadza z Cu. Porównując opisane parametry stwierdzono, że sadze podawane dolistnie wyraźniej wpływają na aparat fotosyntetyczny obniżając wydajność kwantową fotosyntezy niż sadze podawane dokorzeniowo. Najwyższymi indeksami tolerancji (nawet powyżej 100%) charakteryzowały się rośliny rosnące na podłożach z dodatkiem sadzy powstałej w obecności katalizatora zawierającego żelazo. Uzyskane wyniki dowodzą, że zastosowanie odpowiedniego dodatku paliwowego powoduje, że powstała sadza może nie tylko nie wykazywać szkodliwego wpływu na rośliny, ale w odpowiednich stężeniach poprawiać stan fizjologiczny roślin szczególnie, gdy jest podawana dokorzeniowo. Przykładem takiej sadzy może być sadza powstała w obecności nowo opracowanego dodatku paliwowego z żelazem.

Literatura

1. Mokrzycki E., Uliasz-Bocheńczyk A., Gospodarka pierwotnymi nośnikami energii w Polsce a ochrona środowiska przyrodniczego, Rocznik Ochrona Środowiska (2009), Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Ochrony Środowiska, tom: 11, s.: 103-131.
2. Burzała B., Chyc M., Soot deposit – toxic waste, Archives of Waste Management and Environmental Protection (2009), tom 14, suplement 3, s.: 65-70.
3. Kopacz A., W pogoni za sadzą, Wiadomości chemiczne (2014), nr 68, s. 919 – 939.
4. Bounding the role of black carbon in the climate system: A scientific assessment, praca zbiorowa, Journal of Geophysical Research: Atmospheres (2013), tom 118, str. 5380 – 5552.
5. Kim K-H., Jahan S.A., Kabir E., A review on human health perspective on air pollution with respect to allergies and asthma, Environment International 59 (2013), str.: 41 – 52.
6. Lehmann J., Crowley D., Hockaday W.C., Masiello C.A., Rillig M.C., Thies J., Biochar effects on soil biota – a review, Soil Biology & Biochemistry 43 (2011), str. 1812 – 1836.
7. Chyc M., Znaczenie dodatków paliwowych w procesach spalania paliw stałych, Prace Naukowe GIG – Górnictwo i Środowisko (2012), tom 1, str. 5 – 16.
8. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kononowicz A.K., Łuchniak P., Wiktorek-Smagur A., *Arabidopsis thaliana* - metody genetycznej transformacji, Postępy biologii komórki (2009), tom 36, suplement nr 25, str. 177-179.
9. Koornneef M., Meinke D., The development of *Arabidopsis* as a model plant, The Plant Journal 61 (2010), str.: 909 – 921.
10. The *Arabidopsis* Information Resource:
<http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp> (stan na dzień 27.05.2014 r.).
11. Gepstein S., Horowitz B.A., The impact of *Arabidopsis* research on plant biotechnology, Biotechnology Advances (1995), tom 13, nr 3, str.: 403 – 414.
12. Bojko M., Waloszek A., Treska E., Kozłowska N., Strzałka K., Wpływ miedzi na kiełkowanie nasion *Cardaminopsis arenosa* z populacji z terenów skażonych przez górnictwo cynkowo-olowiowe, dawnej kopalni miedzi oraz nieskażonych w hodowli *in vitro*, Innowacyjne

- rozwiązania rewitalizacji terenów zdegradowanych, Wydawca : Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Katowice 2014, str.: 165 – 179.
13. Wilkins D.A., A technique for the measurement of lead tolerance in plants, *Nature* (1957), tom 180, str.: 37 - 38.
 14. Wilkins D.A., The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth, *New Phytol* (1978) tom:80, str.: 623 - 633.
 15. Kopcewicz J., Lewak S., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
 16. Kalaji M.H., Łoboda T., *Fluorescencja chlorofili w badaniach stanu fizjologicznego roślin*, Wydawnictwo SGGW (2010).
 17. Lichtenthaler H.K., *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes, Methods in Enzymology* (1987), tom 148, str.: 350 – 381.
 18. Pyłka-Gutowska E., *Ekologia z ochroną środowiska. Przewodnik*, Wydawnictwo Oświata, Warszawa 2000.
 19. Chyc M.R., Burzała B., Soot deposit - toxic waste, *Archives of Waste Management and Environmental Protection* (2012) tom 14, issue 3, str.: 65 – 70.
 20. Malińska K., *Biowęgiel odpowiedzią na aktualne problem ochrony środowiska, Inżynieria i Ochrona Środowiska* (2012) tom 15, str.: 387 – 403.
 21. Prasad M.N.V., Strzałka K., *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plant*, Wydawca: Kluwer Academic Publishers (2002).
 22. Yruela I., Copper in plants, *Braz. J. Plant Physiology* (2005) str.: 145 – 146.
 23. Siwek M., *Rośliny w skażonym metalami ciężkimi środowisku przemysłowym. Pobieranie, transport i toksyczność metali ciężkich (śladowych)*, *Wiadomości Botaniczne* (2008) tom 52, str.: 7 -22.
 24. Grzyb J., Waloszek A., Latowski D., Więckowski S., Effect of cadmium on ferredoxin: NADP+ oxidoreductase activity, *J. Inorg. Biochem.* (2004) tom 98, nr 3, str.: 1338 – 1346.
 25. Burzyński M., Kłobus G., Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd and Pb stress, *Photosynthetica* (2004) tom 42, str.: 505 – 510.
 26. Prasad M.N.V., Malec P., Waloszek A., Bojko M., Strzałka K., Physiological response of *Lemna trisulca* L. (duck-weed) to cadmium and copper bioaccumulation, *Plant Science* (2001) tom 161, str.: 881 – 889.
 27. Wodala B., Eitel G., Gyula T.N., Ördög A., Horvath F., Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P₇₀₀ absorbance in pea leaves, *Photosynthetica* (2012) tom 50, str.: 380 – 386.
 28. Latowski D., Kuczyńska P., Strzałka K., Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress., *Redox Report* (2011) tom 16, str.: 78-90.
 29. Moraleda-Munoz A., Pérez J., Fontes M., Murillo F.J., Muñoz-Dorado J., Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus Xanthus*, *Molecular Microbiology* (2005) tom 56, str.: 1159-1168.
 30. Irazusta V., Nieto-Peñalver C., Cabral M.E., Amoroso M.J., de Figuerola L.I.C., Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-1, *Process Biochemistry* (2013), tom 48, str.: 803-809.
-

