

WPLYW RTĘCI (II) NA WARUNKI AERACYJNE PODŁOŻA Z UDZIAŁEM *AZOLLA CAROLINIANA* WILLD

R.P. Bennicelli¹, Z. Stepniewska^{1,2}, A. Banach¹, K. Szajnocha¹

¹Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski
al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin
email: bennic@kul.lublin.pl

²Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-209 Lublin 27

Streszczenie. W wielu zbiornikach wodnych obserwuje się niedobory tlenu spowodowane wprowadzaniem do nich zanieczyszczeń, prowadzące do zamierania w nich życia. Jednym ze sposobów przywrócenia równowagi jest wykorzystanie roślin wodnych, które mogą transportować tlen przez system korzeniowy do wód. W obecności tlenu następuje rozkład nagromadzonej materii organicznej czyniąc w ten sposób wody bardziej czyste.

Przeprowadzone badania nad zmianą takich parametrów środowiska jak ODR, Eh i pH w trakcie hodowli *Azolla caroliniana* Willd wykazały, że wystąpił wyraźny wzrost natlenienia podłoża 9. dnia doświadczenia o $16 \mu\text{g}\cdot\text{O}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, co w porównaniu z kontrolą stanowi 35% wzrost w roztworze zawierającym $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ Hg(II). Jednocześnie podczas 12. dniowej hodowli roślina pobrała od 32 do 43% rtęci obecnej w podłożu.

Słowa kluczowe: *Azolla caroliniana* Willd, Hg (II), natlenienie, wydatek mikrodyfuzji tlenu (ODR).

WSTĘP

Tlen jest jednym z ważniejszym pierwiastkiem na Ziemi, niezbędnym dla aerobów. Jako pierwszoplanowy akceptor elektronów umożliwia przebieg wielu procesów biochemicznych, niezbędnych dla funkcjonowania organizmów [6]. Dlatego niedobór tlenu wpływa szczególnie niekorzystnie powodując zaburzenia w ich funkcjonowaniu, a nawet śmierć [12].

Do powstawania niedoboru tlenu w wodach przyczynia się zanieczyszczenie środowiska, a szczególnie związki N i P powodujące eutrofizację wód, prowadzącą do wymierania życia w zbiornikach.

Sposobem na poprawę natlenienia wód może być użycie roślin wodnych, jak np. *Lemna minor*, które rosnąc wydzielają O_2 do wody (jako produkt fotosyntezy), co przyspiesza oczyszczanie się wód z materii organicznej.

Rośliną nieco zbliżoną do rzęsy występującej szeroko w naszych warunkach klimatycznych jest drobna paproć wodna *Azolla*, która jest powszechną na powierzchni wód stojących i wolno płynących w klimacie tropikalnym i umiarkowanym. Jej obecność stwierdzono ostatnio również w Polsce [15]. Roślina ta żyje w symbiozie z sinicą *Anabaena azollae*, która posiada zdolność do wiązania azotu atmosferycznego do formy przyswajalnej przez paproć. Dzięki tej symbiozie *Azolla* jest od lat stosowana jako zielony nawóz na polach ryżowych Azji [7,13]. Z drugiej strony dowiedziono, że roślina ta potrafi usuwać liczne substancje obecne w wodach jak biogeny, związki organiczne czy jony metali [1-5,9,10,16-18].

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, czy *Azolla caroliniana* Willd jest w stanie podwyższać natlenianie podłoża zawierającego zanieczyszczenia w postaci jonów Hg(II), gdyż wcześniejsze badania [11] zwróciły uwagę na aktywny udział paproci w natlenianiu pożywki.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie prowadzono w 4 akwariach, zawierających pożywkę podstawową sporządzoną wg przepisu International Rice Research Institute [14] w ilości 3 dm^3 oraz środek przeciwglonowy Algin. Pożywka ta nie zawierała żadnych form azotu, aby umożliwić *Azolla* korzystanie z azotu dostarczonego przez symbionta. Do 3 akwariów wprowadzono jony Hg(II) w stężeniach 0,1, 0,5 i $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, otrzymując w ten sposób 4 kombinacje wraz z akwariem stanowiącym kontrolę. Akwaria przysłonięto wokół folią aluminiową, aby zapewnić prawidłowe warunki do rozwoju korzeni. Do tak przygotowanych akwariów wprowadzono po wyhodowanej wcześniej paproci pobranej z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Warszawskiego. Zastosowano sztuczne oświetlenie o natężeniu 15 klx, zapewniające 16-godzinny fotoperiod. Hodowlę prowadzono w temperaturze powietrza - średnio 23°C , temperatura pożywki wynosiła $25\text{-}26^\circ\text{C}$.

Cykl doświadczalny trwał 12 dni, podczas którego wykonano 6 pomiarów parametrów aeracyjnych podłoża, takich jak: wydatek mikrodyfuzji tlenu (ODR), potencjał redoks (Eh) oraz odczyn (pH).

Pomiar ODR był wykonany metodą zaproponowaną przez Malickiego i Walczaka [8] przy użyciu 5 elektrod Pt, umieszczonych w pożywce na wysokości końców korzeni roślin (2,5 cm). Wartość ODR wyznaczono korzystając ze wzoru:

$$\text{ODR} = I \cdot 7,65 \quad [\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}] \quad (1)$$

gdzie: I – wartość średnia natężenia wskazań 5 elektrod, 7,65 – współczynnik zależny od powierzchni elektrody (0,5×4 mm).

Do pomiaru Eh wykorzystano miernik z automatyczną kompensacją temperatury wyposażony w 6 elektrod platynowych (pomiarowe) oraz kalomelową (NEK) jako odniesienia. Wartość potencjału redoks wyznaczono przez uśrednienie odczytu z 6 elektrod, a następnie uwzględniając potencjał elektrody kalomelowej w temperaturze 20°C, wynoszący +247 mV do dokonano obliczeń Eh wg wzoru:

$$E_h = E_{ZM} + 247 \quad [\text{mV}] \quad (2)$$

Odczyn roztworu wyznaczono miernikiem PIONEER 65 firmy Radiometer, wyposażonym w kombinowaną elektrodę szklaną (typ pHCS977).

WYNIKI I Dyskusja

Wyniki stanu aeracji podłoża, opisane parametrami ODR, Eh i pH zostały przedstawione w Tabeli 1.

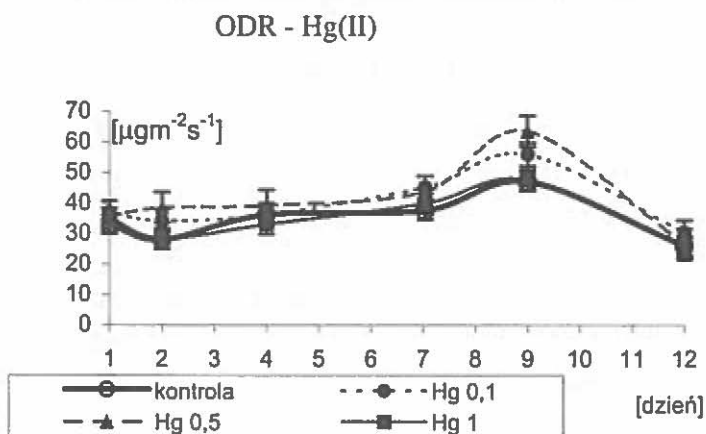
Tabela 1. Parametry natlenienia podłoża w czasie doświadczenia
Table 1. Aeration parameters of medium during the experiment period

Kombinacja	Dzień	ODR*	Eh**	pH	Kombinacja	Dzień	ODR*	Eh**	pH
Kontrola	1	33,05	488,00	4,12	Hg 0,5 mg·dm ⁻³	1	35,57	492,00	4,06
	2	28,00	630,90	4,00		2	38,56	614,17	3,94
	4	36,26	475,87	3,95		4	39,24	453,40	3,84
	7	37,64	545,45	3,93		7	43,83	492,35	3,78
	9	47,05	514,15	4,09		9	63,57	505,55	3,87
	12	26,16	547,10	4,02		12	26,62	543,30	3,77
Hg 0,1 mg·dm ⁻³	1	36,95	469,00	4,07	Hg 1,0 mg·dm ⁻³	1	35,11	500,05	4,09
	2	34,20	563,43	4,00		2	28,46	621,63	3,96
	4	36,26	464,10	3,80		4	33,05	466,30	3,84
	7	45,21	517,95	3,74		7	39,93	502,00	3,89
	9	56,00	516,55	3,90		9	47,74	500,85	4,03
	12	30,52	545,40	3,82		12	25,70	548,75	4,04

* ODR [$\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$], ** Eh [mV]

W warunkach kontrolnych wartości ODR i Eh posiadały niewielką tendencję wzrostową do 9 dnia hodowli, wykazując maksymalną wartość mikrodyfuzji tlenu wyższą o 42% od początkowej, po czym nastąpiło jego obniżenie do wartości wyjściowych, przypadające na 12 dzień.

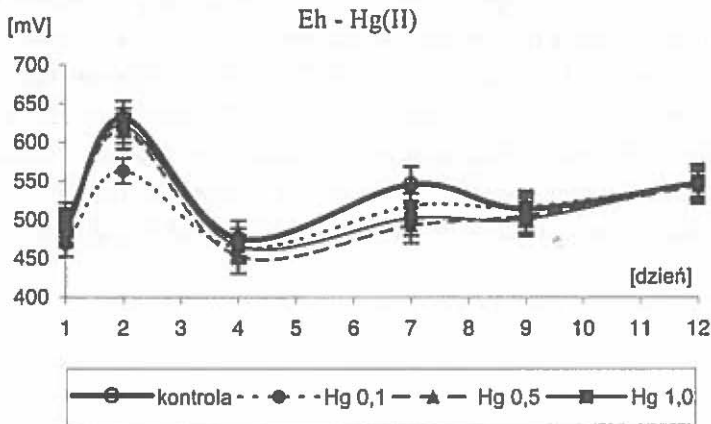
W kombinacjach z niższymi stężeniami Hg(II), do $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, zanotowano wyższe wartości ODR niż w kontroli (do kilkunastu jednostek). Przez początkowe dni wartość ODR utrzymywała się na stałym poziomie, ale od 7. gwałtownie wzrastała osiągając maksimum, przypadające na 9. dzień (wartości o 56% wyższe niż w kontroli), po którym spadała do poziomu początkowego. Największa różnica w stosunku do kontroli miała miejsce 9. dnia i wynosiła około $8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ przy dodatku $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ Hg(II) i była dwukrotnie większa przy dawce $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ Hg(II). W przypadku stężenia 1 ppm, różnice wartości ODR były już niewielkie, rzędu $3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ODR (Rys. 1), co stanowiło 36% wzrost natężenia dyfuzji tlenu, w porównaniu ze stanem wyjściowym.



Rys. 1. Mikrodyfuzja tlenu podczas hodowli *Azolla* przy poziomie Hg (II): 0; 0,1; 0,5 i $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Fig. 1. Oxygen diffusion rate during the *Azolla* culture at Hg (II): 0; 0.1; 0.5 and $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ level.

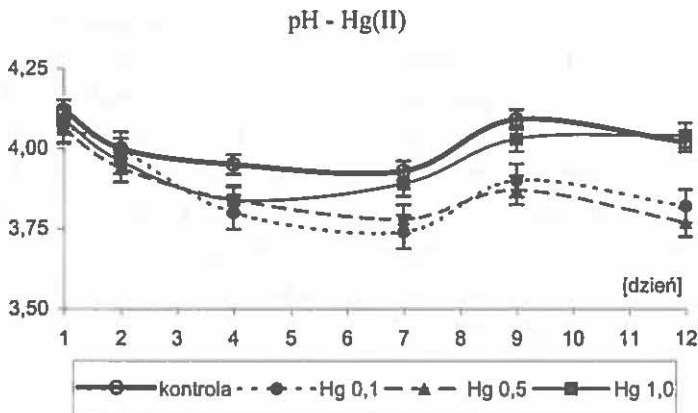
Stwierdzono również wpływ dodanych jonów Hg(II) na obniżenie wartości potencjału redoks od 7. do 9. dnia pomiarowego (Rys. 2), nawet o 53 mV w odniesieniu do kontroli, w kombinacji z $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ Hg. W pozostałych terminach pomiarowych wartości Eh były zbliżone do kontroli i utrzymywały się w optymalnym dla paprotki zakresie 500-600 mV [2].



Rys. 2. Potencjał redoks przy poziomie Hg (II): 0; 0,1; 0,5 i 1 mg-dm⁻³.

Fig. 2. The redox potential in the medium at Hg (II): 0; 0.1; 0.5 and 1 mg dm⁻³ level.

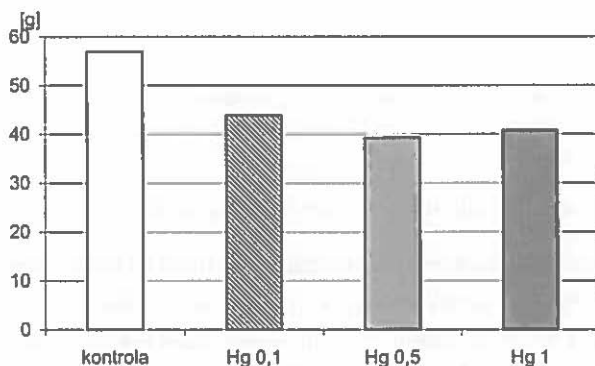
W przypadku pH zaobserwowano niewielkie obniżenie wartości w porównaniu z kontrolą, przy czym przy niższych stężeniach (do 0,5 mg-dm⁻³) obserwowano większe rozbieżności w pH niż w przypadku 1 ppm, gdzie największa różnica wystąpiła 4. dnia i osiągała 0,11 jednostki. W pozostałych kombinacjach różnice wyraźne były już 4. dnia i utrzymywały się do końca hodowli (różnica do 0,25 jednostki). Odczyn roztworu oscylował wokół wartości pH 4 (Rys. 3).



Rys. 3. Odczyn podłoża przy poziomie Hg (II): 0; 0,1; 0,5 i 1 mg-dm⁻³.

Fig. 3. The reaction in the medium at Hg (II): 0; 0.1; 0.5 and 1 mg dm⁻³ level.

Azolla rosła znacznie gorzej na podłożu wzbogaconym jonami Hg(II). We wszystkich kombinacjach stwierdzono zahamowanie wzrostu paproci wyrażone obniżeniem biomasy, która stanowiła około 78 i 72% w odpowiednich wariantach doświadczenia z: 0,1; 0,5 i 1 mg Hg(II)·dm⁻³ (Rys. 4). Ilość pobranej z podłoża rtęci przez rośliny *Azolla* była znacząca i wynosiła zależnie od stężenia w roztworze od 32 do 43% obecnych jonów Hg (II). Zawartość Hg w tkankach paproci w przeliczeniu na suchą masę wynosiła w odpowiednich kombinacjach od 70,8 do 578 mg·kg⁻¹.



Rys. 4. Biomasa *Azolla* przy poziomie Hg (II): 0; 0,1; 0,5 i 1 mg·dm⁻³.
Fig. 4. Biomass of *Azolla* at Hg (II): 0; 0.1; 0.5 and 1 mg dm⁻³ level.

WNIOSKI

Analiza zmian parametrów aeracyjnych podłoża wzbogaconego jonami rtęci, na którym hodowano *Azolla* pozwala stwierdzić, że w obecności jonów tego metalu nastąpił wzrost natężenia dyfuzji tlenu w pożywce, maksymalnie o 16 µg·O₂ m⁻²·s⁻¹ w porównaniu z kontrolą (do 35%). Wartości ODR wzrosły gwałtownie pod koniec doświadczenia, co może przedstawiać reakcję rośliny bądź symbionta na obecność substancji toksycznych w podłożu. Taka obserwacja pozwala przypuszczać, że paproć rosnąca na zanieczyszczonych rtęcią wodach może sprzyjać ich oczyszczaniu poprzez pobieranie tego metalu (do 45%) i innych metali oraz wydzielanie tlenu do podłoża.

PIŚMIENICTWO

1. Antunes A.P.M., Watkins G.M., Duncan J.R.: Batch studies on the removal of gold (III) from aqueous solution by *Azolla filiculoides*. *Biotechnology Letters* 23, 249-251, 2001.

2. **Bennicelli R.P.:** Wplyw form azotu w podlozu na potencjal redoks i wzrost biomasy *Azolla filiculoides* Lam. Acta Agrophysica, 38, 7-14, 2000.
3. **Bennicelli R.P., Stępniewska Z., Szajnocha K., Banach A.:** Wplyw kadmu na natlenianie podloza i wzrost biomasy *Azolla Caroliniana* Willd. Acta Agrophysica, 84, 13020, 2003.
4. **Fogarty R.V., Dostalek P., Patzak M., Votruba J., Tel-Or E., Tobin J.M.:** Metal removal by immobilised and non-immobilised *Azolla filiculoides*. Biotechnology Techniques 13, 533-538, 1999.
5. **Forni C., Chen J., Tancioni L., Caiola M.G.:** Evaluation of the fern *Azolla* for growth, nitrogen and phosphorus removal from wastewater. Water Research, 35(6), 1592-1598, 2001.
6. **Kopcewicz J., Lewak S.:** Podstawy fizjologii roślin. Wyd. naukowe PWN, 248-284, 342-372, 1998.
7. **Lumpkin T.A., Plucknett D.L.:** *Azolla* as a green manure: use and management in crop production. Westview tropical agriculture series 5, 230, 1982.
8. **Malicki M., Walczak R.:** A gauge for redox potential and the oxygen diffusion rate in the soils with automatic regulation of cathode potential. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 220, 447-452, 1983.
9. **Mishra B.B., Nanda D.R., Misra B.N.:** Accumulation of mercury by *Azolla* and its effect on growth. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39(4), 701-707, 1987.
10. **Sanyahumbi D., Duncan J.R., Zhao M., van Hille R.:** Removal of lead from solution by the non-viable biomass of the water fern *Azolla filiculoides*. Biotechnology Letters 20(8), 745-747, 1998.
11. **Stępniewska Z., Bennicelli R.P.:** Dynamika procesów oksydoredukcyjnych w pożywce i w osadzie z udziałem *Azolla caroliniana* Willd. Acta Agrophysica, 53, 159-164, 2001.
12. **Stępniewski W., Gliński J.:** Reakcje roślin na stan aeracyjny gleby. Problemy Agrofizyki, 45, 5-55, 1985.
13. **Watanabe I., Bai K.Z., Berja N.S., Espina L.R., Ho O., Subidhi R.P.R.:** The *Azolla-Anabaena* complex and its use in rice culture. IRRI Res Pap., Ser 69, 1981.
14. **Watanabe I., Roger P.A., Ladha J.K., Van Hove C.:** Biofertilizer Germplasm Collections at IRRI. IRRI, 8, 1992.
15. **Wolkowicki D.:** *Azolla filiculoides* (Pteridophyta, Azollaceae) w Polsce. Fragm. Flor. Geobot. Ser. Polonica, 6, 165-170, 1999.
16. **Zhao M., Duncan J.R.:** Batch removal of hexivalent chromium by *Azolla filiculoides*. Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 179-182, 1997.
17. **Zhao M., Duncan J.R.:** Bed-depth-service-time analysis on column removal of Zn^{2+} using *Azolla filiculoides*. Biotechnology Letters, 20(1), 37-39, 1998.
18. **Zhao M., Duncan J.R.:** Removal and recovery of nickel from aqueous solution and electroplating rinse effluent using *Azolla filiculoides*. Process Biochemistry, 33(3), 249-255, 1998.

INFLUENCE OF MERCURY (II) ON AERATION STATUS
OF MEDIUM WITH PARTICIPATION OF *AZOLLA CAROLINIANA*

R.P. Bennicelli¹, Z. Stepniewska^{1,2}, A. Banach¹, K. Szajnocha¹

¹Department of Biochemistry and Environmental Chemistry, Catholic University of Lublin
al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin
email: benniric@kul.lublin.pl

²Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Doświadczalna 4, 20-209 Lublin 27

Abstract. Deficit of the oxygen is observed in a many water containers what is caused by introducing into them pollutants which conduct live to expire there. One of the ways to restore balance is using aquatic plants which may transport oxygen by their root system into waters. In presence of the oxygen follows decay of accumulated organic matter making in this way waters more clear.

The experiments carried out to determine changes such environmental parameters like ODR, Eh and pH during *Azolla caroliniana* Willd culture showed that it caused a clear increase aeration of the medium on the 9th day of the experiment about $16 \mu\text{g O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in solution containing 0.5 mg dm^{-3} of Hg(II) what in comparison to the control was 35% increase. Simultaneous, during 12 days of culture the plant took up from 32 to 43% of mercury presented in the medium, respectively to concentrations in the medium.

Keywords: aeration, *Azolla caroliniana* Willd, Hg (II), oxygen diffusion rate (ODR).