

TAMARA CHADZINIKOLAU¹, MONIKA KOZŁOWSKA¹, MIROSLAW MLECZEK²

¹Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Katedra Chemii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

WPLYW JONÓW WAPNIA I MAGNEZU NA PROCES REMEDIACJI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH METALAMI CIĘŻKIMI Z WYKORZYSTANIEM *SALIX VIMINALIS* L.

CALCIUM AND MAGNESIUM INFLUENCE ON PHYTOREMEDIATION
OF HEAVY METALS USING *SALIX VIMINALIS* L.

Streszczenie. Przeprowadzono badania modelowe na sadzonkach zdrewniałych wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.), rosnących w kulturach hydroponicznych, w kontrolowanych warunkach świetlnych i termicznych. Sadzonki uprawiano na pożywce Knopa, zawierającej wapń i magnez w stosunku: 20:1, 1:10, 1:1/4 oraz 4:1 (kombinacja kontrolna). Do pożywek dodawano kadm lub ołów w dwóch stężeniach – 0,1 mM (jako poziom kontrolny) i 0,5 mM. Prowadzono oznaczenia biometryczne, obejmujące długość wyrastających pędów, wielkość liści i długość korzeni. Stwierdzono, że stosunek ilościowy Ca względem Mg znacznie modyfikował wzrost roślin i bioakumulację Cd i Pb. Zwiększenie zawartości wapnia w podłożu (Ca:Mg = 20:1) stymulowało wzrost wierzby, jednak bioakumulacja metali ciężkich w tych roślinach nie była największa.

Słowa kluczowe: fitoremediacja, metale ciężkie, *Salix viminalis*

Wstęp

Przywracanie czystości gleb i wód terenów zdegradowanych jest niezwykle istotne dla poprawy jakości środowiska oraz ochrony ekosystemów. Tam, gdzie nie są konieczne szybkie i radykalne sposoby, które niejednokrotnie ingerują w środowisko i powodują nieodwracalne zmiany w życiu biologicznym gleb lub wód, można zastosować „łagodne” formy oczyszczania z pomocą roślin, czyli fitoremediację (MEAGHER 2000, WÓJCIK 2000). Stosunkowo dużą odporność na znaczne stężenia metali ciężkich w glebie wykazują niektóre odmiany topoli (*Populus* spp.) oraz liczne gatunki i odmia-

ny wierzby (*Salix* spp.), zwłaszcza wierzba wiciowa (*Salix viminalis*) (KLANG-WESTIN i PERTTU 2002, PULFORD i WATSON 2003, MAGDZIAK i IN. 2011). Wierzba ta, zwana konopianką, jest przykładem wieloletniej rośliny drzewiastej, charakteryzującej się stosunkowo dużą zdolnością akumulacji metali ciężkich, a jednocześnie intensywnym przyrostem biomasy. Omawiane badania dotyczyły mechanizmu tolerancji wierzby względem metali ciężkich (kadm i ołów), z uwzględnieniem poziomu akumulacji pierwiastków w organach tej rośliny.

Celem badań było określenie wpływu obecnych w środowisku jonów wapnia i magnezu na właściwości fitoremediacyjne wierzby. Stwierdzono wpływ tych pierwiastków na stosunek jonów wodorowych do wodorotlenowych w podłożu (wartość pH), warunkujący ich biodostępność, a także bezpośrednie oddziaływanie Ca i Mg na transport oraz wiązanie toksycznych jonów kadmu i ołowiu. Badania objęły też ocenę bioakumulacji kadmu i ołowiu oraz charakterystykę biometryczną roślin.

Material i metody

Jednoroczne, wyrównane pod względem grubości pędy wierzby zostały pobrane z wydzielonej części plantacji *Salix viminalis* w okolicach Nowego Tomyśla (w listopadzie, po naturalnym opadzie liści i po pierwszych przymrozkach). Ze środkowych części pędów przygotowano zdrewniałe sadzonki długości 25 cm i średnicy około 1,5 cm, które przechowywano w wilgotnym piasku i temperaturze 0-4°C do czasu założenia doświadczeń. Sadzonki były wstępnie ukorzenione w rozcieńczonym roztworze pożywki Knopa, a następnie zakładano kultury hydroponiczne w pojemnikach hodowlanych, w obojętnym chemicznie keramzycie (granulat 8 × 16 mm). Doświadczenia prowadzono w komorze fitotronowej, w kontrolowanych warunkach świetlnych, termicznych i przy określonej wilgotności przez 21 dni marca 2010 roku.

Zastosowano cztery kombinacje Ca:Mg, tj. 1:4 – pożywka kontrolna (fizjologiczna); 20:1 – zwiększony poziom wapnia, a zmniejszony magnezu; 1:1/4 – zmniejszony poziom magnezu; 1:10 – zwiększony poziom magnezu. Skład pożywek podano w tabeli 1.

Kadm i ołów dostarczano w postaci soli azotanowych (V), w stężeniach 0,1 mM (poziom kontrolny) oraz 0,5 mM.

Obserwacje i pomiary biometryczne pędów wykonywano przez 21 dni, natomiast zawartość metali oraz długość korzeni przybyszowych (DK) mierzono tylko po zakończeniu doświadczenia. Wybijające pędy zostały zbadane z wyodrębnieniem liści i łodyg. Co kilka dni mierzona była długość i szerokość blaszek liściowych oraz długości wybijających pędów (DP). Obliczono wskaźnik powierzchni liści (WPL), tj. iloraz długości i szerokości (w najszerszym miejscu). Prowadzono także dokumentację fotograficzną roślin doświadczalnych.

Zawartość kadmu i ołowiu w pędach została oznaczona metodą spektrometrii absorpcji atomowej (AAS), z wykorzystaniem Spektrometru AA Varian Spectra AA 200 Plus. Próby materiału roślinnego przeznaczone do oznaczeń poddawano mineralizacji w piecu mikrofalowym Mars 5 X-press firmy CEM, przy wykorzystaniu HNO₃ i H₂O₂. Do analiz pobierane były trzy reprezentatywne próbki, każda o masie 1 g (w trzech powtórzeniach), po uprzednim wysuszeniu w suszarce laboratoryjnej przez 48 godzin w temperaturze 105 ±5°C i zmieleniu w młynku elektrycznym. Stosowano jednopierwiastkowe lampy katodowe HCL firm Varian oraz Perkin Elmer. Dla każdego z metali wykonano procedurę optymalizacji warunków oznaczania.

Chadzinikolau T., Kozłowska M., Mleczek M., 2011. Wpływ jonów wapnia i magnezu na proces remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi z wykorzystaniem *Salix viminalis* L. Nauka Przyr. Technol. 5, 6, #121.

Tabela 1. Skład pożywek (cm³)

Table 1. Composition of nutrient solutions (cm³)

Stosunek molowy Molar ratio Ca:Mg	H ₂ O	Ca(NO ₃) ₂ 10%	KNO ₃ 10%	KCl 10%	KH ₂ PO ₄ 2,5%	MgSO ₄ 5%	FeCl ₃ 5%	Mikroskładniki Micronutrient
4:1	942,1	20	5	2,4	20	10	0,5	2
20:1	862,1	100	5	2,4	20	10	0,5	2
1:1/4	964,6	5	5	2,4	20	2,5	0,5	2
1:10	867,1	5	5	2,4	20	100	0,5	2

Przeprowadzono dwa niezależne doświadczenia, każdą kombinację w czterech powtórzeniach (cztery donice, w każdej jedna sadzonka). Istotność różnic określono za pomocą analizy wariancji i testu t Tukeya ($P = 0,05$), wykorzystując program Statistica 9.0. Jednorodne grupy pomiędzy analizowanymi kombinacjami zostały oznaczone kolejnymi literami alfabetu.

Wyniki i dyskusja

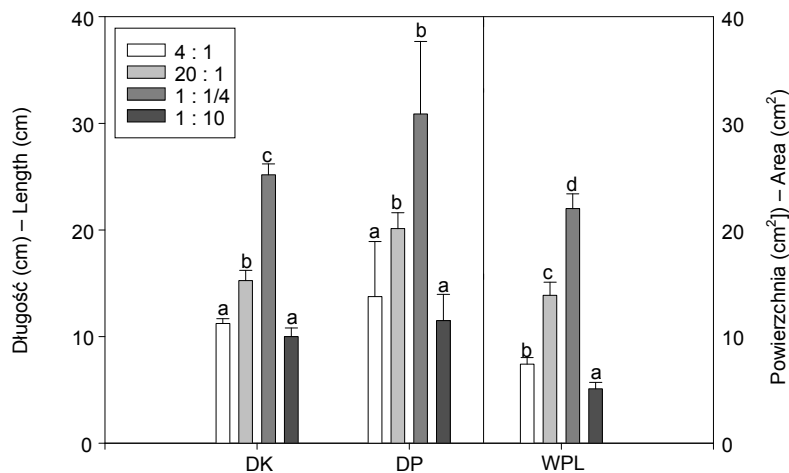
W literaturze opisane są interakcje między niektórymi metalami ciężkimi w procesie sorpcji przez rośliny, jak również wzajemne relacje między metalami pod względem ich biologicznej przyswajalności (AIT ALI i IN. 2004, YANQUN i IN. 2004). Znane są również interakcje zachodzące w roślinach w trakcie procesu fitoremediacji (KAMNEV i LELIE 2000). Istotą niniejszych badań była ocena wpływu jonów wapnia i magnezu na właściwości fitoremediacyjne wierzby. Na podstawie oznaczeń biometrycznych stwierdzono, że stosunek ilościowy Ca do Mg znacznie modyfikował bioakumulację Cd i Pb oraz wzrost wierzby. Efektywność akumulacji Cd i Pb była malejąca, zgodnie z formułą $1:10 > 4:1 > 20:1 > 1:1/4$; wyższa dla łodyg niż dla blaszek liściowych (tab. 2). Podobną zależność zaobserwowano w badaniach wcześniejszych, dotyczących akumulacji jonów Cu i Zn w organach wierzby (MLECZEK i IN. 2012). Istnieją nieliczne dane literaturowe dotyczące tego zagadnienia. Duże stężenie magnezu i wapnia zmniejszało hiperakumulację niklu u *Alyssum bertolonii* (VERGNANO GAMB I IN. 1992). U innego hiperakumulatora *Silene armeria* wpływ stosunku Ca do Mg na akumulację miedzi i tolerancję na obecność tego pierwiastka był uzależniony od adaptacji ekotypów rośliny do warunków glebowych, w tym zawartości wapnia w glebie. W badaniach hydroponicznych magnez zwiększał tolerancję roślin na duże stężenia Cu, ale nie u ekotypów przystosowanych do gleb wapiennych (LOMBINI i IN. 2003). Pobieranie toksycznych metali może być modulowane przez blokowanie ich w obrębie ściany komórkowej i zewnętrznej powierzchni plazmolemy. W tym względzie jony wapnia mogą być efektywniejsze niż jony magnezu (LOMBINI i IN. 2003). Ze względu na ścisłą kontrolę transportu jonów wapnia pomiędzy apoplastem i symplastem rośliny są tolerancyjne na duże wewnątrzkomórkowe stężenie tego kationu. Pierwiastek ten może więc mieć wpływ na pozakomórkową akumulację metali ciężkich, a jednocześnie na intensywność wzrostu wydłużeniowego roślin.

Tabela 2. Akumulacja kadmu i ołowiu w liściach wierzby
 Table 2. Accumulation of cadmium and lead in willow leaves

Kombinacje Combinations		$\mu\text{g Cd} \times \text{g} \text{ś.w.m.}^{-1}$ $\mu\text{g Cd} \times \text{g f.m.}^{-1}$		$\mu\text{g Pb} \times \text{g} \text{ś.w.m.}^{-1}$ $\mu\text{g Pb} \times \text{g f.m.}^{-1}$	
Ca:Mg	metal w pożywce metal in nutrient solution	liście leaves	pędy shoots	liście leafs	pędy shoots
4:1	kontrola control	4,06 ±0,04	6,15 ±0,02	2,14 ±0,03	4,35 ±0,03
	Cd ²⁺	4,28 ±0,04	6,15 ±0,04	2,95 ±0,04	4,78 ±0,04
	Pb ²⁺	4,00 ±0,05	8,97 ±0,07	2,66 ±0,03	7,42 ±0,04
20:1	kontrola control	3,24 ±0,03	4,70 ±0,03	1,84 ±0,04	3,54 ±0,02
	Cd ²⁺	3,64 ±0,04	5,52 ±0,04	2,35 ±0,05	4,34 ±0,04
	Pb ²⁺	3,48 ±0,02	5,54 ±0,03	2,07 ±0,03	6,74 ±0,08
1:1/4	kontrola control	3,88 ±0,05	4,83 ±0,07	1,86 ±0,54	3,86 ±0,05
	Cd ²⁺	3,12 ±0,04	5,00 ±0,04	1,82 ±0,01	3,81 ±0,03
	Pb ²⁺	3,16 ±0,03	7,73 ±0,05	1,92 ±0,44	6,26 ±0,03
1:10	kontrola control	3,99 ±0,05	6,51 ±0,03	2,63 ±0,03	5,14 ±0,04
	Cd ²⁺	4,93 ±0,05	6,86 ±0,04	3,58 ±0,02	5,54 ±0,03
	Pb ²⁺	4,69 ±0,05	9,27 ±0,02	3,29 ±0,03	8,82 ±0,04

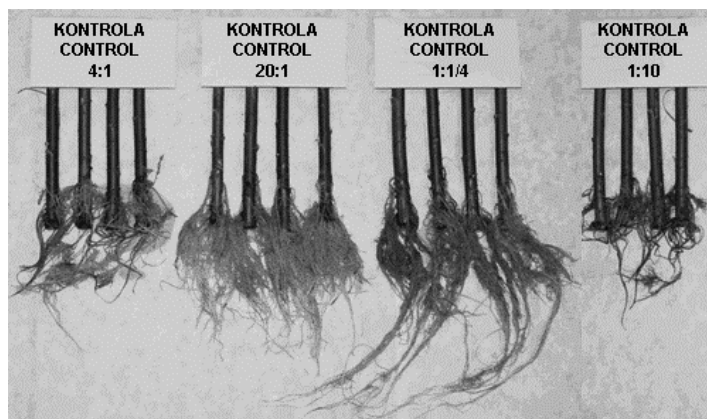
W przypadku wierzby stosunek Ca:Mg wpływał modyfikująco na wzrost, co przedstawiono na rycinach 1-4. Wzrost pędów (DP) był najniższy przy stosunku Ca:Mg 1:10, a o największej intensywności w kombinacjach 20:1 i 1:1/4. Zwiększenie ilości Mg w pożywce przy obniżonym poziomie Ca ograniczało zatem wzrost pędów (rys. 1 i 3). Powierzchnia blaszek liściowych (WPL) różniła się dwu-, a nawet trzykrotnie między kombinacjami (rys. 1, 4). Podobne obserwacje dotyczyły korzeni przybyszowych. Szczególną stymulację stwierdzono w pożywce o stosunku wapnia do magnezu 20:1 oraz 1:1/4. Natomiast we wszystkich zmodyfikowanych relacjach Ca:Mg, poza kontrolną 4:1, zaobserwowano zredukowaną strefę włośnikową. Przy zwiększonej ilości wapnia w pożywce 20:1 korzenie przybyszowe były liczne i najjaśniejsze (rys. 1 i 2).

Drugim elementem badań była ocena wpływu podwyższonej zawartości Cd i Pb w pożywce (0,5 mM) na wzrost roślin w warunkach zróżnicowanego stosunku Ca:Mg. Podwyższony poziom kadmu, a jeszcze silniej ołowiu, stymulował wzrost nowo wyrastających pędów w kombinacjach 4:1 i 20:1 (rys. 5). Powierzchnia blaszek liściowych również była większa (rys. 5 i 6). Zasadniczo nie obserwowano takiego efektu w pozostałych dwóch kombinacjach. Obniżenie poziomu Ca i Mg (1:1/4) miało zdecydowanie hamujący wpływ na wzrost liści. W przypadku korzeni przybyszowych na pożywce 1:1/4 długość korzeni była stymulowana pod wpływem jonów Cd i Pb, natomiast na pożywce 4:1 metale działały hamująco.



Rys. 1. Długość korzeni (DK) i pędów (DP) oraz wskaźnik powierzchni liści (WPL) wierzby na pożywkach o zróżnicowanym stosunku Ca:Mg

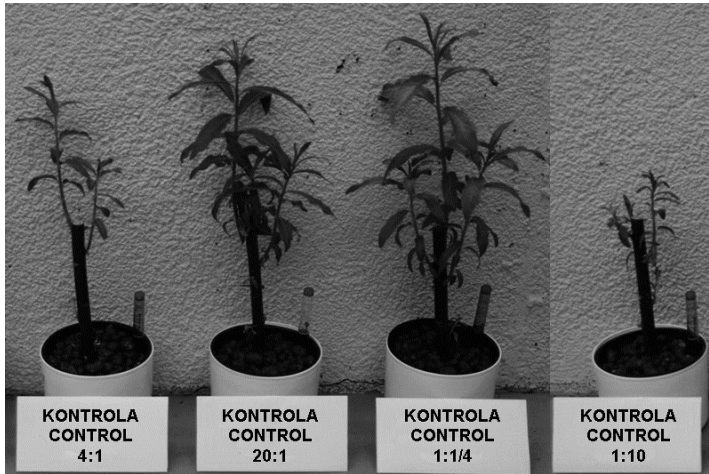
Fig. 1. Length of roots (DK) and shoots (DP) and leaf area rate (WPL) of willow on nutrient solutions with differentiated Ca:Mg ratio



Rys. 2. Korzenie wierzby rosnącej na pożywkach o zróżnicowanym stosunku Ca:Mg

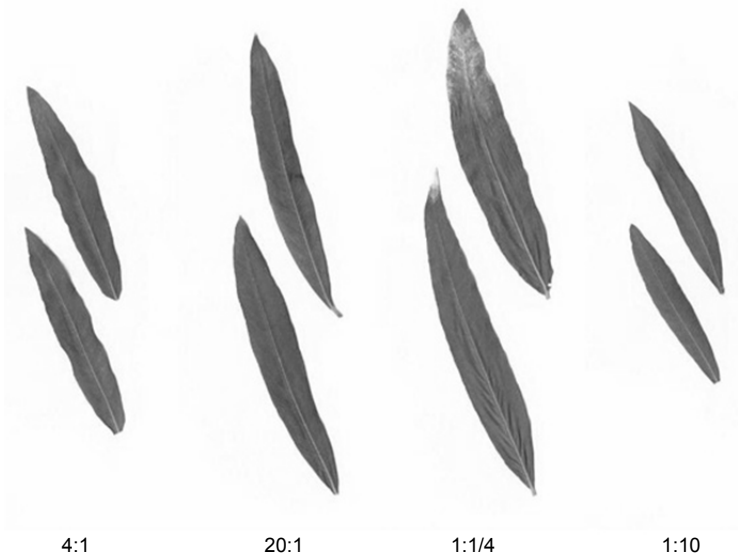
Fig. 2. Roots of willow grown on nutrient solution with differentiated Ca:Mg ratio

Z przeprowadzonych badań wynika, że pięciokrotnie podwyższony poziom Ca, przy niezmięnionej zawartości Mg (20:1), stymulował wzrost pędów wierzby (największa biomasa). Rośliny te miały zmniejszoną efektywność bioakumulacji przy zwiększonej masie korzeniowej, czyli większej powierzchni chłonnej. Stosunkowo intensywny wzrost pędów stwierdzono przy ograniczonej zawartości obu pierwiastków (1:1/4), jednak rośliny te wykazywały objawy niedoboru magnezu (chlorozy liści), pędy były



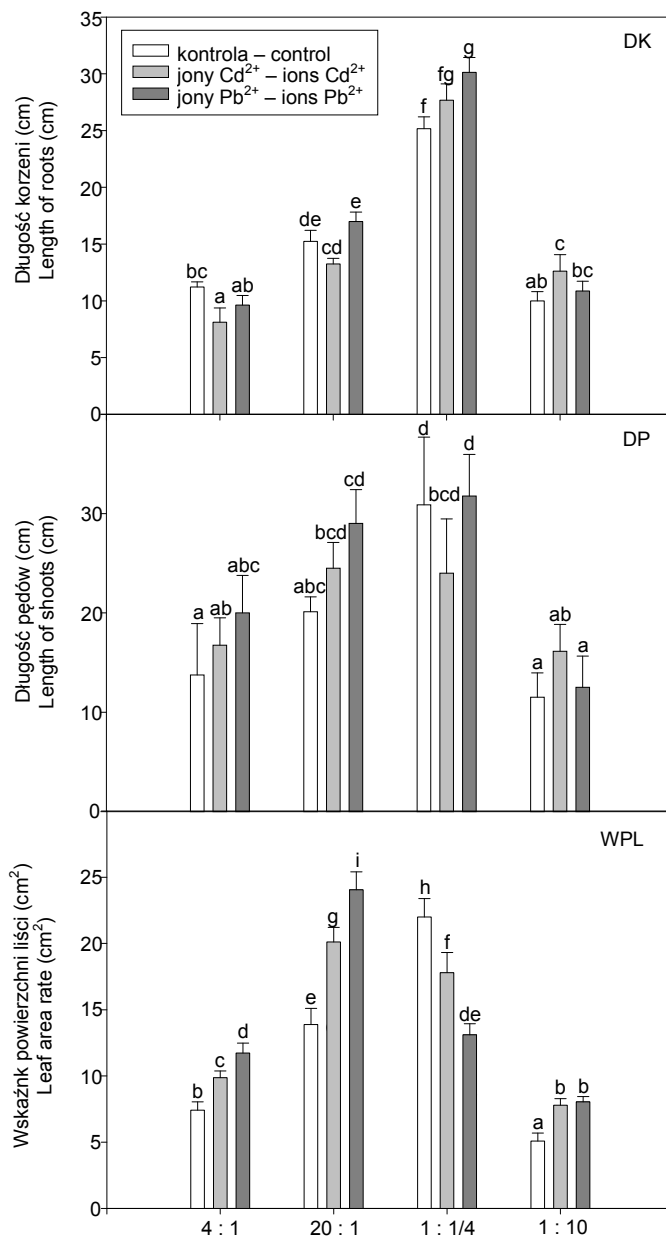
Rys. 3. Sadzonki wierzby rosnącej na pożywkach o zróżnicowanym stosunku Ca:Mg

Fig. 3. Seedlings of willow grown on nutrient solutions with differentiated Ca:Mg ratio



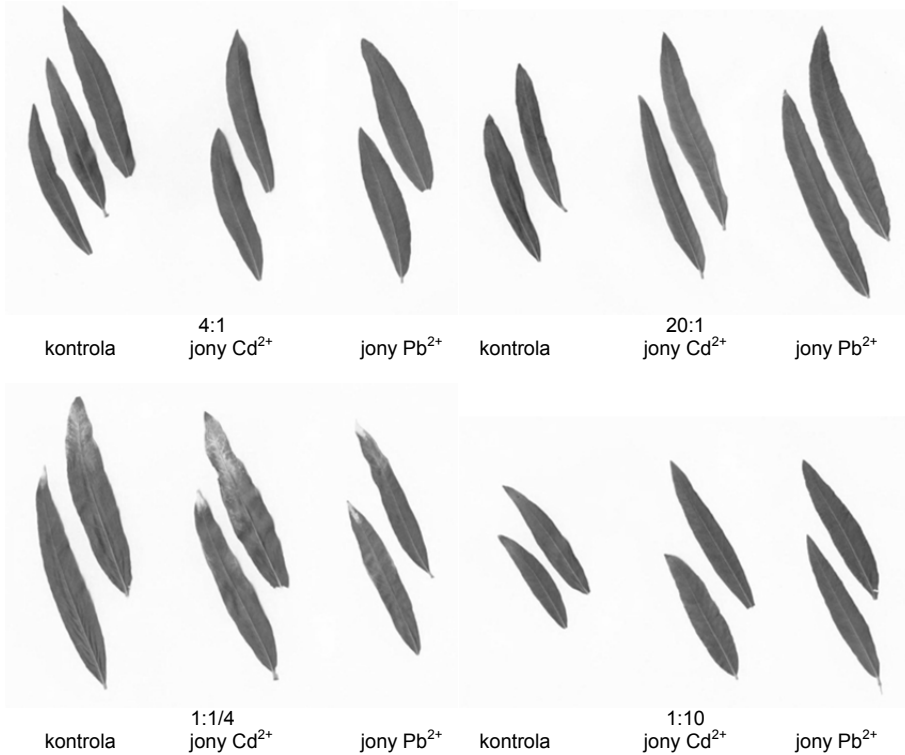
Rys. 4. Liście wierzby rosnącej na pożywkach o zróżnicowanym stosunku Ca:Mg

Fig. 4. Leaves of willow grown on nutrient solution with differentiated Ca:Mg ratio



Rys. 5. Długość korzeni (DK) i pędów (DP) oraz wskaźnik powierzchni liści (WPL) wierzby na pożywkach o zróżnicowanym stosunku Ca:Mg z dodatkiem jonów Cd i Pb

Fig. 5. Length of roots (DK) and shoots (DP) and leaf area rate (WPL) of willow on nutrient solutions with differentiated Ca:Mg ratio with addition of Cd and Pb ions



Rys. 6. Liście wierzby rosnącej na pożywkach o zróżnicowanym stosunku Ca:Mg z dodatkiem Cd i Pb

Fig. 6. Leaves of willow on nutrient solutions with differentiated Ca:Mg ratio with addition of Cd and Pb

wiotkie, a korzenie silnie wydłużone. Przy zmniejszonej zawartości Ca, a zwiększonej Mg (1:10) wzrost był hamowany, a efektywność akumulacji największa. Dodatek kadmu do pożywek zasadniczo hamował wzrost, w tym szczególnie korzeni. W przypadku zwiększonej zawartości ołowiu w roślinach obserwowano natomiast stymulację wzrostu.

Wnioski

1. Stosunek wapnia do magnezu w podłożu wywierał wpływ na efektywność akumulacji kadmu i ołowiu w organach *Salix viminalis*. Akumulacja malała zgodnie z formułą $1:10 > 4:1 > 20:1 > 1:1/4$.

2. Zwiększenie zawartości wapnia w podłożu (Ca:Mg = 20:1) znacząco stymulowało wzrost wierzby, jednak bioakumulacja kadmu i ołowiu w tych roślinach nie była największa.

3. Przy stężeniu metalu w podłożu odpowiadającym zanieczyszczeniom gleb lub wyższym (0,5 mM) kadm hamował wzrost, natomiast ołów działał stymulująco (szczególnie przy fizjologicznym stosunku Ca:Mg = 4:1 oraz 20:1).

Literatura

- AIT ALI N., PILAR BERNAL M., ATER M., 2004. Tolerance and bioaccumulation of cadmium by *Phragmites australis* grown in the presence of elevated concentrations of cadmium, copper and zinc. *Aquat. Bot.* 80: 163-176.
- KAMNEV A.A., LELIE VAN DER D., 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Biosci. Rep.* 20: 239-258.
- KLANG-WESTIN E., PERTTU K., 2002. Effects of nutrient supply and soil cadmium concentration on cadmium removal by willow. *Biomass. Bioenerg.* 23: 41.
- LOMBINI A., LLUGANY M., POSCHENRIEDER CH., DINELLI E., BARCELO J., 2003. Influence of Ca/Mg ratio of Cu resistance in three *Silene armeria* ecotypes adapted to calcareous soil or to different, Ni- or Cu-enriched, serpentine sites. *J. Plant Physiol.*, 160: 1451-1456.
- MAGDZIAK Z., KOZŁOWSKA M., KACZMAREK Z., MLECZEK M., CHADZINIKOLAU T., DRZEWIECKA K., GOLIŃSKI P., 2011. Influence of Ca/Mg ratio on phytoextraction properties of *Salix viminalis*. II. Secretion of low molecular weight organic acids to the rhizosphere. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 74: 33-40.
- MEAGHER R.B., 2000. Phytoremediation of toxic element al and organic pollutants. *Rev. Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 2: 153-162.
- MLECZEK M., KOZŁOWSKA M., KACZMAREK Z., CHADZINIKOLAU T., GOLIŃSKI P., 2012. Influence of Ca/Mg ratio on phytoextraction properties of *Salix viminalis*. I. The effectiveness of Cd, Cu, Pb, and Zn bioaccumulation and plant growth. *Int. J. Phytoremed.* 14: 75-88.
- PULFORD I.D., WATSON C., 2003. Phytoremediation of heavy metals-contaminated land by trees – a review. *Environ. Int.* 29: 529-540.
- VERGNANO GAMBI O., GABBRIELLI R., PANDOLFINI T., 1992. Some aspects of the metabolism of *Alyssum bertolonii* Desv. W: *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*. Red. A.J.M. Baker, J. Proctor, R.D. Reeves. Intercept, Andover: 319-329.
- WÓJCİK M., 2000. Fitoremediacja — sposób oczyszczania środowiska. *Kosmos* 49: 135-148.
- YANQUN Z., YUAN L., SCHVARTZ CH., LANGLADEC L., FAN L., 2004. Accumulation of Pb, Cd, Cu and Zn in plants and hyperaccumulator choice in Lamping lead-zinc mine area, China. *Environ. Int.* 30: 567-576.

CALCIUM AND MAGNESIUM INFLUENCE ON PHYTOREMEDIATION OF HEAVY METALS USING *SALIX VIMINALIS* L.

Summary. The aim of the study was to determine the role of calcium and magnesium on phytoremediation of heavy metals using willow. The study was conducted with a model system of woody cuttings of *Salix viminalis*, growing in hydroponic culture, under controlled conditions. Seedlings were cultivated on Knop nutrient solution containing calcium and magnesium (Ca:Mg) in the ratio as follows: 20:1, 1:10, 1:1/4, and 4:1 (control relation). For each variant of nutrient solution, cadmium and lead were added separately in two concentrations of 0.1 mM (control level) and 0.5 mM. Biometric determinations were carried out covering the length of shoots, leaf

Chadzinikolau T., Kozłowska M., Mleczek M., 2011. Wpływ jonów wapnia i magnezu na proces remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi z wykorzystaniem *Salix viminalis* L. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 6, #121.

area and the length of roots. It was found that the Ca:Mg ratio significantly modified plant growth and bioaccumulation of Cd and Pb. Stimulation of *Salix* growth was the effect of the increase of Ca in the medium (Ca:Mg = 20:1), however, bioaccumulation of both metals was not the highest.

Key words: phytoremediation, heavy metals, *Salix viminalis*

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Tamara Chadzinikolau, Katedra Fizjologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland, e-mail: tamarisch@o2.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

26.09.2011

Do cytowania – For citation:

*Chadzinikolau T., Kozłowska M., Mleczek M., 2011. Wpływ jonów wapnia i magnezu na proces remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi z wykorzystaniem *Salix viminalis* L. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 6, #121.*