

Donald Włodkowiec, Barbara Tomaszewska
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Zakład Biochemii

Oddziaływanie jonów ołowiu na kiełkowanie i wzrost korzeni siewek *Brassica napus* i *Medicago sativa*

The influence of the lead ions on germination and growth of *Brassica napus* and *Medicago sativa* seedlings

Słowa kluczowe: jony ołowiu, kiełkowanie, wzrost korzeni, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, fitoremediacja

Key words: lead ions, germination, root growth, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, phytoremediation

W pracy przedstawiono wyniki wstępnych, porównawczych badań nad oddziaływaniem ołowiu na zdolność kiełkowania nasion i elongacji korzeni siewek *Brassica napus* (odm. Lisek) i *Medicago sativa*. Zastosowano 72 godz. biotest kiełkowania i wzrostu korzeni na szalkach Petriego. Rośliny poddawano ekspozycji na następujące stężenia azotanu ołowiu ($Pb(NO_3)_2$): 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2000 mg/l. Stwierdzono zbliżone efekty hamowania wzrostu korzeni u obu badanych gatunków. Zaobserwowano zróżnicowaną inhibicję kiełkowania — rzepak cechował się większą odpornością w górnych granicach dawek. Sumaryczna ocena odporności obydwu gatunków wyrażona jako indeks kiełkowania (%GI) osiągała następujące wartości dla *B. napus*: Pb 1 mg/l – 101; Pb 10 mg/l – 105; Pb 100 mg/l – 73,9; Pb 250 mg/l – 44,08; Pb 500 mg/l – 26; Pb 1000 mg/l – 0; Pb 2000 mg/l – 0 i dla *M. sativa*: Pb 1 mg/l – 96,6; Pb 10 mg/l – 96,48; Pb 100 mg/l – 67,15; Pb 250 mg/l – 43,27; Pb 500 mg/l – 14,9; Pb 1000 mg/l – 4,6; Pb 2000 mg/l – 0. Dalsze prace wymagają określenia i porównania odporności obu gatunków w długoterminowych hodowlach hydroponicznych i glebowych, oraz określenie efektywności pobierania i kumulacji ołowiu w poszczególnych organach *B. napus* i *M. sativa*.

This work presents preliminary, comparative studies on influence of lead ions on germination and early root growth of *Brassica napus* and *Medicago sativa* seedlings. A 72 hour toxicity test of germination and root elongation was used to assess different lead ion concentrations: 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2000 mg/l $Pb(NO_3)_2$. Similar effects of root growth inhibition were estimated for both species. For the germination inhibition rates, higher resistance was observed for *B. napus* than for *M. sativa* seeds. Cumulative resistance assessment of both species to lead contamination, using germination index parameter (%GI), achieved following results for *B. napus*: Pb 1 mg/l – 101; Pb 10 mg/l – 105; Pb 100 mg/l – 73.9; Pb 250 mg/l – 44.08; Pb 500 mg/l – 26; Pb 1000 mg/l – 0; Pb 2000 mg/l – 0 and for *M. sativa*: Pb 1 mg/l – 96.6; Pb 10 mg/l – 96.48; Pb 100 mg/l – 67.15; Pb 250 mg/l – 43.27; Pb 500 mg/l – 14.9; Pb 1000 mg/l – 4.6; Pb 2000 mg/l – 0. Further research will require evaluation of sensitivity of *B. napus* and *M. sativa* in both hydroponic and soil cultures. In addition it will be important to estimate uptake and cumulation efficiency of lead ions in different plant tissues.

Wstęp

Fitoremediacja gleb i wód zanieczyszczonych metalami ciężkimi polega głównie na fitoekstrakcji ksenobiotyków przez wyselekcjonowane gatunki roślin. Fitoekstrakcja zanieczyszczeń nieorganicznych (np. metali ciężkich, radionuklidów) jest związana z ich pobieraniem przez korzenie roślin i dalszym transportem do części nadziemnych (Kumar i in. 1995). W organach tych ksenobiotyki podlegają kumulacji w niezmienionej postaci. Metoda fitoekstrakcji polega na obsadzaniu obszarów skażonych gatunkami wykazującymi zdolność zwiększonej akumulacji jonów metali w tkankach. Organy wysyczone zanieczyszczeniami są następnie zbierane i poddawane obróbce. Ostatecznie uzyskana skażona masa roślin jest wielokrotnie niższa od masy ziemi lub wody, którą należałoby poddać obróbce fizyko-chemicznej w klasycznych metodach usuwania metali ciężkich (Schnoor 2002). Biomasa może podlegać dalszemu spopieleniu i składowaniu lub odzyskowi metalu (*ang. phytomining*).

Badania związane z fitoekstrakcją dotyczą możliwości jej zastosowania w eliminacji m.in. metali (Pb, Cd, Hg, Ni, Zn, Cr, Cu, Ag, Co, Mn, Mo), metalloidów (As, Se), radionuklidów (Sr, Cs, U) i niektórych niemetałów (Al, B) (Singh i in. 1997).

Powszechnie wykorzystywanym w warunkach polowych gatunkiem jest m.in. *Brassica juncea*. Obecnie wiele ośrodków naukowych prowadzi intensywne badania roślin użytkowych nad ich ewentualną przydatnością w procesach fitoekstrakcji. Cechami predysponującymi selekcjonowane gatunki do zastosowań praktycznych jest przede wszystkim odporność roślin określana poprzez zdolność do kiełkowania i wzrostu w warunkach silnego zanieczyszczenia (Peralta i in. 2000).

W pracy przedstawiono wyniki wstępnych, porównawczych badań nad oddziaływaniem ołowiu na zdolność kiełkowania nasion i elongacji korzeni siewek *Brassica napus* (odm. Lisek) i *Medicago sativa* w aspekcie potencjalnych zastosowań w fitoremediacji.

Material i metody

Nasiona

Materiał stanowiły nieinkrustowane nasiona dwóch gatunków roślin: rzepaku (*Brassica napus*, odm. Lisek) [IHAR, Poznań] i lucerny (*Medicago sativa*) [Centrala Nasienna, Poznań]. Do czasu eksperymentów nasiona przechowywano w temperaturze 5°C. Przed rozpoczęciem biotestów fitotoksyczności nasiona adaptowano przez 24 godziny w temperaturze 21°C. Nasiona nie były wstępnie namaczane ani sterylizowane.

Badane związki

Nasiona poddawano ekspozycji na zróżnicowane stężenia azotanu ołowiu [Pb(NO₃)₂ PoCh Gliwice]: 1 mg/l, 10 mg/l, 100 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l, 2000 mg/l. Roztwory Pb(NO₃)₂ przygotowano z użyciem wody destylowanej. Wartości pH badanych roztworów i próby kontrolnej (woda destylowana) wahały się w granicach 5–5,5.

Testy fitotoksyczności

Wykorzystano zmodyfikowany test kiełkowania / elongacji korzenia (Burton i in. 2001) do oceny fitotoksyczności jonów ołowiu.

Każdy test przebiegał w zamkniętych, 9 cm szklanych szalkach Petriego zawierających 3 ml roztworu Pb(NO₃)₂ przykrytego sączkiem Whatman N^o1. Próby kontrolne zawierały 3 ml wody destylowanej przykrytej sączkiem Whatman N^o1. Na sączku umieszczano po 10 nasion badanych gatunków.

Szalki Petriego przetrzymywano w ciemności w temperaturze 21 ± 1°C. Czas trwania biotestów wynosił 72 godziny.

Po okresie inkubacji liczono ilość wykiełkowanych nasion oraz mierzono długość korzeni. Za wykiełkowane uznawano rośliny posiadające wierzchołek korzenia przynajmniej 2 mm długości. Długość korzenia mierzono od wierzchołka do podstawy hypokotyła.

Dla sumarycznej oceny obydwu parametrów wyliczano indeks kiełkowania (%GI — ang. *germination index*) zgodnie ze wzorem (Barbero i in. 2001):

$$\%GI = 100 \times (G_S \times L_S) / (G_C \times L_C)$$

gdzie:

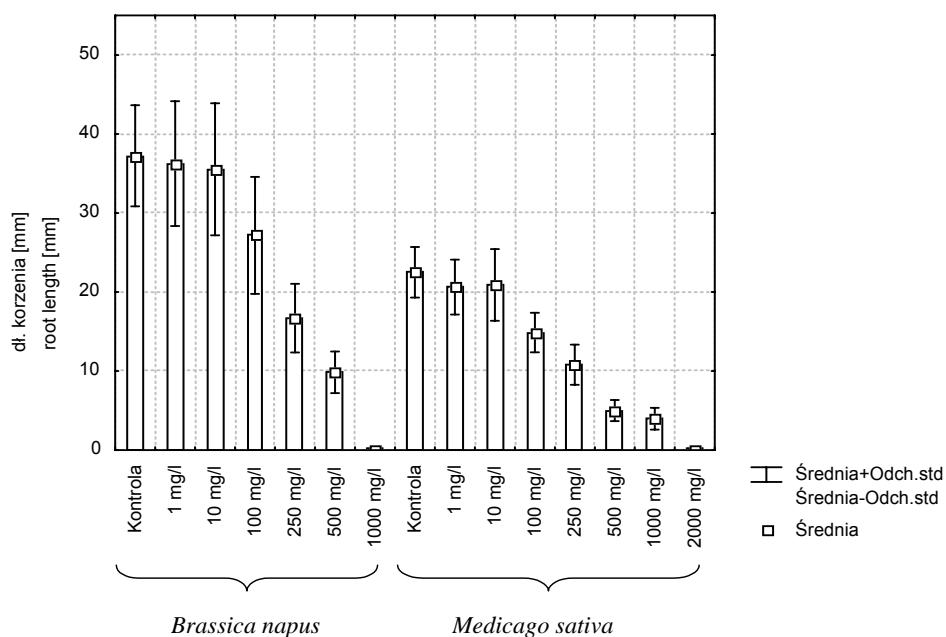
G_S i G_C — liczba wykiełkowanych nasion odpowiednio w badanej próbie i kontroli
L_S i L_C — długości korzeni (mm) w badanej próbie i kontroli.

Określono również oddziaływanie badanych stężeń Pb(NO₃)₂ na zdolność kiełkowania i wzrostu korzenia, co wyrażono jako % hamowania / stymulacji kiełkowania i wzrostu korzenia.

Każdy eksperyment przeprowadzono w 4 powtórzeniach.

Wyniki

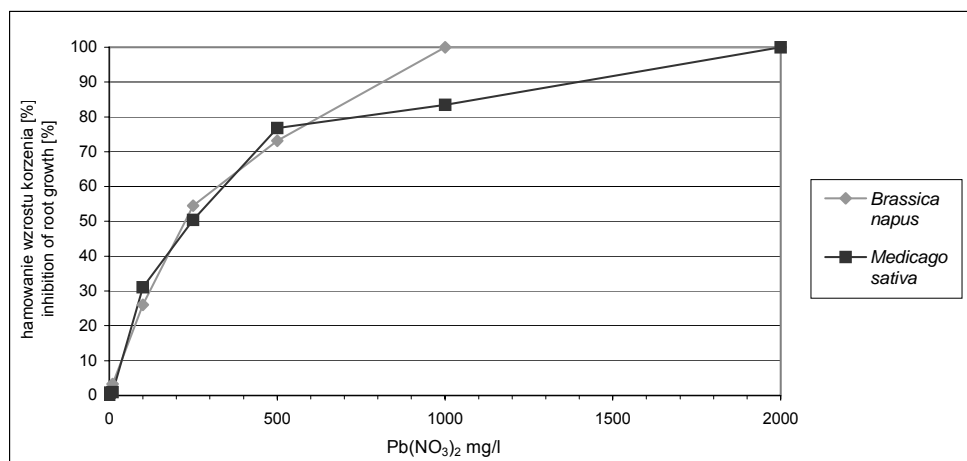
W przeprowadzonych badaniach stwierdzono zbliżone efekty oddziaływania zróżnicowanych stężeń jonów ołowiu na przyrost korzeni obydwu badanych gatunków (rys. 1). Hamowanie wzrostu korzeni *B. napus* i *M. sativa* ulegało odchyleniu w górnych granicach dawek — 100 mg/l Pb(NO₃)₂: *B. napus* 100% hamowania, *M. sativa* 82% hamowania (rys. 2).



Kontrola — woda destylowana

Stężenie jonów ołowiu $Pb(NO_3)_2$ — Lead ion concentration

Rys. 1. Porównanie końcowej długości korzeni siewek *B. napus* i *M. sativa* eksponowanych na różne stężenia jonów ołowiu — Comparison of final root length of *B. napus* and *M. sativa* seedlings exposed to different lead ion concentrations



Rys. 2. Hamowanie wzrostu korzenia siewek *B. napus* i *M. sativa* w warunkach ekspozycji na zróżnicowane dawki jonów ołowiu — Inhibition of root growth of *B. napus* and *M. sativa* seedlings by different lead contamination doses

Zaobserwowano zróżnicowane oddziaływanie jonów ołowiu na zdolność kiełkowania. *Brassica napus* cechował się wysoką odpornością w górnych granicach dawek oraz niewielką stymulacją kiełkowania w dolnych granicach stężeń (rys. 3).

Sumaryczną ocenę odporności obydwu gatunków wyrażoną jako indeks kiełkowania %GI prezentuje rysunek 4.

Wnioski

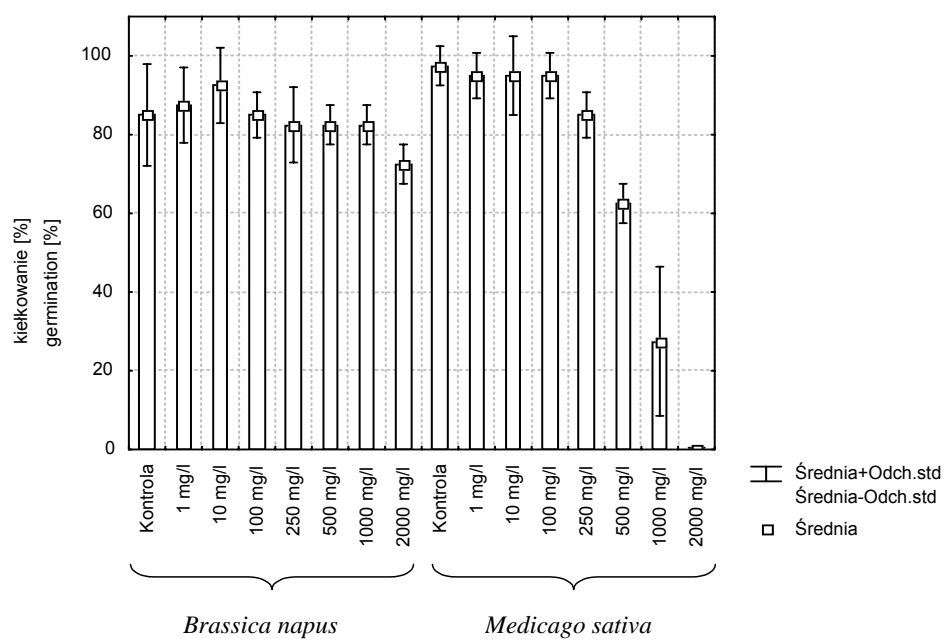
Przeprowadzone badania sugerują, że ekotoksykologiczne biotesty fitotoksyczności mogą wspomagać badania screeningowe mające na celu selekcję gatunków o potencjalnym znaczeniu w fitoremediacji. Ocena odporności selekcjonowanych gatunków na zanieczyszczenie jest pierwszym kryterium ich doboru w technikach fitoremediacji obszarów zdegradowanych. Rośliny muszą bowiem odznaczać się zdolnością do kiełkowania i wzrostu w warunkach przewlekłej ekspozycji np. na metale ciężkie. Kiełkowanie i wzrost korzenia są dwoma krytycznymi stadiami w rozwoju roślin, które są szczególnie wrażliwe na oddziaływanie szeregu zanieczyszczeń (Chang i in. 1997, Wang 1987). Z tego względu te pierwsze stadia rozwoju roślin mogą zostać wykorzystane zarówno do szybkiej biooceny zanieczyszczeń gleb i wód, jak również do wstępnej oceny, selekcji i charakterystyki odpornych na zanieczyszczenie gatunków roślin użytkowych (Wang i Williams 1988).

Wstępne badania wskazują, że *Brassica napus* odznacza się lepszą tolerancją jonów ołowiu w odniesieniu do zdolności kiełkowania w porównaniu do *Medicago sativa*. Zdolność kiełkowania *M. sativa* jest silnie hamowana przy wysokich stężeniach jonów ołowiu. W przypadku *B. napus* zaobserwowano również niewielką stymulację zdolności kiełkowania przy niskich dawkach $Pb(NO_3)_2$ (1 i 10 mg/l).

Oddziaływanie jonów ołowiu na hamowanie wzrostu korzeni siewek ocenianych gatunków wykazuje duże podobieństwa. Jedynie w górnych granicach stężeń (1000 mg/l) *M. sativa* wykazuje większą odporność w odniesieniu do tego parametru (82% hamowania wzrostu korzenia) w porównaniu z *B. napus* (100% hamowania wzrostu korzenia).

Należy podkreślić, że prezentowane biotesty fitotoksyczności dają jedynie względny obraz odporności badanych gatunków dotyczący warunków pełnej biodostępności jonów ołowiu.

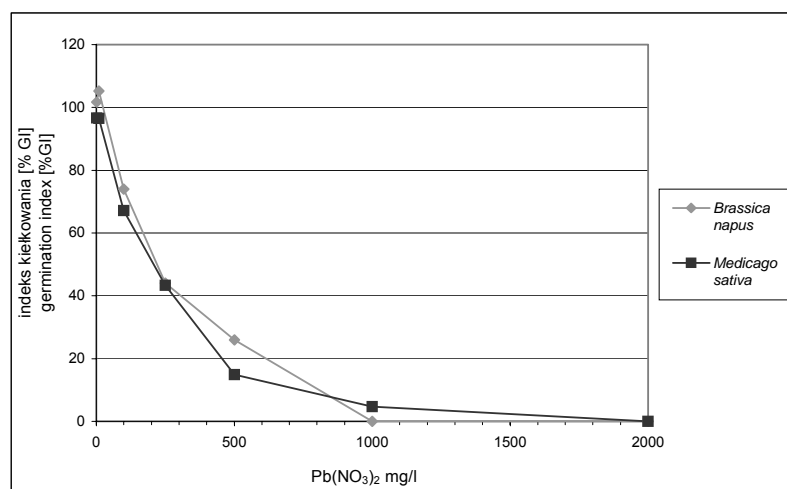
Dalsze prace wymagają określenia i porównania odporności w długoterminowych hodowlach hydroponicznych i glebowych. Dodatkowo ważne jest również określenie dynamiki pobierania i kumulacji ołowiu w poszczególnych organach *Brassica napus* i *Medicago sativa*.



Kontrola — woda destylowana

Stężenie jonów ołowiu $Pb(NO_3)_2$ — Lead ion concentration

Rys. 3. Potencjał kiełkowania nasion *B. napus* i *M. sativa* w warunkach ekspozycji na jony ołowiu
Seed germination of *B. napus* and *M. sativa* exposed to lead ions



Rys. 4. Indeks kiełkowania *B. napus* w porównaniu do *M. sativa* przy różnych stężeniach jonów ołowiu — Germination index of *B. napus* in comparison to *M. sativa* by different lead ions concentrations

Conclusions

This study suggests that ecotoxicological bioassays may assist screening of species of potential significance for phytoremediation. The assessment of contamination resistance of selected species is the first criterion used for selection in phytoremediation techniques of degraded areas. This is because plants have to possess germination and growth ability under chronic exposition e.g. to heavy metals. Germination and root growth are stages in plants development that are critical and especially sensitive to contamination. Therefore these stages may be applied to fast biological assessment of water and soil contamination as well as preliminary assessment, selection and characterization of contamination resistance species of crop plants.

Preliminary studies show that *Brassica napus* is characterized by better lead ion tolerance in comparison with *Medicago sativa* in seed germination assay. The germination of *M. sativa* is strongly inhibited in high lead ions concentration. In case of *B. napus* we also observed weak stimulation of germination under low $Pb(NO_3)_2$ doses (1 and 10 mg/l). The inhibiting effects of lead ions on root growth of seedlings of studied species reveal strong similarity. In seedlings roots growth test *M. sativa* presented higher resistance in the upper limits of lead ions concentrations in comparison with *B. napus*. It should be emphasized that phytotoxicity biotests presented in this study may reveal only a relative image of resistance of studied species under conditions of full bioavailability of lead ions. Both comparison and characterisation of resistance in long-term hydroponic and soil planting need further investigations. Additionally, it is important to determine the dynamics of cumulation and uptake of lead ions in individual organs of *B. napus* and *M. sativa*.

Literatura

- Barbero P., Beltrami M., Baudo R., Rossi D. 2001. Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after limiting treatment. *J. Limnol.*, 60 (2): 269-276.
- Burton G.A., Baudo R., Beltrami M., Rowland C. 2001. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. *J. Limnol.*, 60 (2): 263-267.
- Chang L., Meier J.R., Smith M.K. 1997. Application of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of a lead-contaminated soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 166-171.
- EPA Ecological Effects Test Guidelines, U.S. EPA 1996: OPPTS 850.4229-30.
- Kumar N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.*, 29 (5): 1232-1238.
- Peralta J.R., Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J., Gomez E., Arteaga S., Rascon E., Parsons J.G. 2000. Study of the effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant

- (Medicago sativa)* grown in solid media. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research: 135-140.
- Schnoor J.L. 2002. Phytoremediation of soil and groundwater. GWARTAC Technology Report TE-02-01 (March 2002).
- Singh R.P., Tripathi R.D., Sinha S.K., Maheshwari R., Srivastava H.S. 1997. Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere*, 34 (11): 2467-2493.
- Wang W. 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environ. Toxicol. & Chem.*, 6: 409-414.
- Wang W., Williams J.M. 1988. Screening and monitoring of industrial effluents using phytotoxicity tests. *Environ. Toxicol. & Chem.*, 7: 645-652.