

WPLYW FORM AZOTU W PODŁOŻU NA POTENCJAŁ REDOKS I WZROST BIOMASY *AZOLLA FILICULOIDES* LAM

R. P. Bennicelli^{1,2}

¹Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski
al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin.

²Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27
E-mail: benniric@kul.lublin.pl

Streszczenie: *Azolla filiculoides* Lam. jest paprotką wodną współżyjącą z azot-wiążącą sinicą *Anabaena*, która budzi zainteresowania ze względu na możliwość jej wykorzystania w postaci nawozu zielonego. *Azolla* stała się obiektem badań na całym świecie. Wiedza na temat fizjologicznych i ekologicznych czynników wpływających na wzrost paproci jest istotna w badaniach przyrodniczych ukierunkowanych na jej praktyczne stosowania. Celem tej pracy było zbadanie w warunkach kontrolowanych wpływu różnych form azotu na jego właściwości oksydoredukcyjne (Eh) i przyrost biomasy *Azoll*i. Stwierdzono, że optymalny zakres potencjału redoks wzrostu *Azoll*i zawiera się w przedziale 550–600 mV, a pobór formy azotu azotanowego w podłożu wydaje się być preferowany przez paprotkę w stosunku do azotu wiązanego z atmosfery przez sinicę *Anabaenę*.

Słowa kluczowe: *anabaena*, *azolla filiculoides*, biomasa, potencjał oksydoredukcyjny.

WSTĘP

Azolla (Salviniaceae) to różnozarodnikowa paprotka wodna pochodząca z Ameryki Północnej, występuje na świecie w siedmiu gatunkach.

Przestwory międzykomórkowe w grzbietowych płatkach liści *Azoll*i stanowią mikrośrodowisko dla żyjących w symbiozie bakterii *Anabaena* (Nostocae). *Anabaena azollae* odgrywa decydującą rolę w regulowaniu wzrostu paproci zaspokajając jej wymagania pokarmowe co do azotu, który to *Anabaena* zdolna jest wiązać bezpośrednio z atmosfery.

Unikalny charakter tej symbiozy spowodował w XX wieku wzrost zainteresowania naukowego i rozpoczęto badania obu tych gatunków [1].

Niektóre pytania rodzaju – jaki jest jej optymalny zakres potencjału oksydo-redukcyjnego (Eh) dla wzrostu paprotki, jakie formy azotu znajdujące się w podłożu są wykorzystane przez azollę – częściowo znalazły odpowiedź.

Niniejsza praca ma na celu określenie, w jakiej mierze biomasa – wymierny efekt wykorzystywanych między innymi form azotu w środowisku przez azollę, jest odbiciem warunków oksydoredukcyjnych podłoża.

MATERIAŁ I METODY

W 14-dniowym doświadczeniu stosowano pożywki o różnym składzie, formach i dawkach azotu (40 i 80 ppm N-NO₃ oraz 20 i 40 ppm N-NH₄), a następnie porównywano je z pożywką kontrolną sporządzoną według zalecenia International Rice Research Institute (Tabela 1). Azollę hodowano w zestawie akwariów w kontrolowanych warunkach oświetlenia (16/8 h) i temperatury (20–25°C). W trakcie eksperymentu zmierzono parametry takie jak: pH (elektrometrycznie) i Eh podłoża według metody opisanej przez Glińskiego i Sępniewskiego [4], formy azotu (N-NH₄; N-NO₃) oznaczano w pobieranych próbkach roztworu (10 ml) z podłoża metodą spektrofotometrii absorpcyjnej (FIAstar) [5] oraz określano przyrost biomasy Azolli w różnych kombinacjach po zakończeniu eksperymentu.

Tabela 1. Skład chemiczny pożywki według receptury IRRRI [11]

Table 1. The chemical composition of nutrient solution according to IRRRI [11]

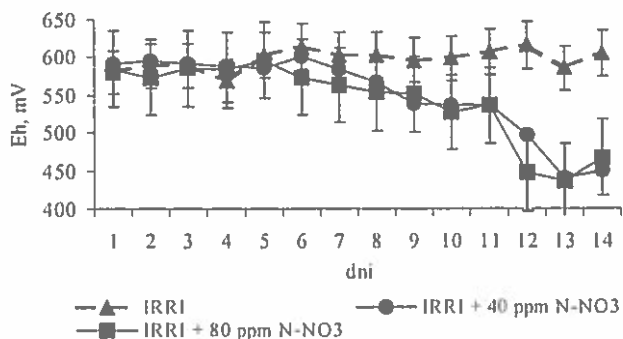
		Stężenie w pożywce (ppm)	Związek
Makroelementy	P	20,0	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O
	K	40,0	K ₂ SO ₄
	Ca	40,0	CaCl ₂ 2 H ₂ O
	Mg	40,0	MgSO ₄ 7 H ₂ O
	Fe	0,5	FeSO ₄ 7 H ₂ O EDTA
Mikroelementy	Mn	0,50	MnCl ₂ 4 H ₂ O
	Mo	0,15	Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O
	B	0,20	H ₃ BO ₃
	Zn	0,01	ZnSO ₄ 7 H ₂ O
	Cu	0,01	CuSO ₄ 5 H ₂ O
	Co	0,01	CoCl ₂ 6 H ₂ O

WYNIKI I Dyskusja

Rysunki od 1 do 4 przedstawiają wyniki wykonanych pomiarów: Eh, pH oraz przyrosty biomasy w zastosowanych kombinacjach. W trakcie hodowli Azolli na podłożu zawierającym azotany (Rys. 1) stwierdzono utrzymywanie się potencjału oksydoredukcyjnego (Eh) na poziomie wyjściowym ok. 600 mV, przez okres 4 dni a następnie wyraźny jego spadek, dochodzący do poziomu 450 mV. Zmianom tym towarzyszyło wyczerpywanie się azotanów w podłożu (Tabela. 2). W kombinacji z dodatkiem N w formie amonowej, potencjał redoks utrzymywał się na stałym poziomie 600 mV \pm 35 mV, podobnie jak w pożywce podstawowej sporządzonej według zalecenia IRRI, pozbawionej soli z udziałem form azotu (Tabela 1; Rys. 2). Ponad 6-krotny przyrost biomasy w stosunku wprowadzanej na początku masy Azolli wystąpił w kombinacji zawierającej 40 ppm N-NO₃ w ciągu badanego okresu, i około 14% niższy od maksymalnego w kombinacji zawierającej 80 ppm N-NO₃. Przyrost biomasy w pożywce podstawowej (IRRI) był o 40% niższy od maksymalnego, która była kombinacja IRRI+40 ppm N-NO₃. Natomiast niewielkie różnice wystąpiły w przyroście biomasy w kombinacjach z formą amonową w podłożu i były one ok. 30% niższe od biomasy z pożywki podstawowej i ponad dwukrotnie niższe od biomasy Azolli wyhodowanej na pożywce z azotanami (Rys. 4). Obniżeniu Eh o 100–150 mV w kombinacjach pożywki z azotanami towarzyszyła zmiana odczynu podłoża, ulegając podwyższeniu o ponad 3 jednostki (pH 9), podczas gdy w podłożu z pożywką podstawową i wzbogaconą w formę amonową ulegała zakwaszaniu o ponad 1,5 jednostki pH (Rys. 3).

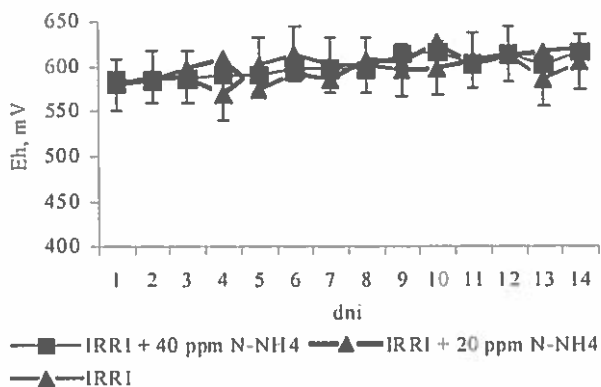
Tabela 2. Dynamika zmian (Δ) parametrów podłoża różnych kombinacjach
Table 2. Changes (Δ) of the measured parameters in different regimes

Nr	Skład kombinacji	Δ Eh (mV)	Δ pH	Δ N-NO ₃ (mmol)	Δ N-NH ₄ (mmol)
1	IRRI (kontrolna)	+35	-0,8	-	-
2	+40 ppm N-NO ₃	-150	+3,5	+0,19	-
3	+80 ppm N-NO ₃	-140	+3,0	-0,48	-
4	+40 ppm N-NH ₄	+32	-1,0	-	+1,33
5	+20 ppm N-NH ₄	+40	-1,5	-	+0,33



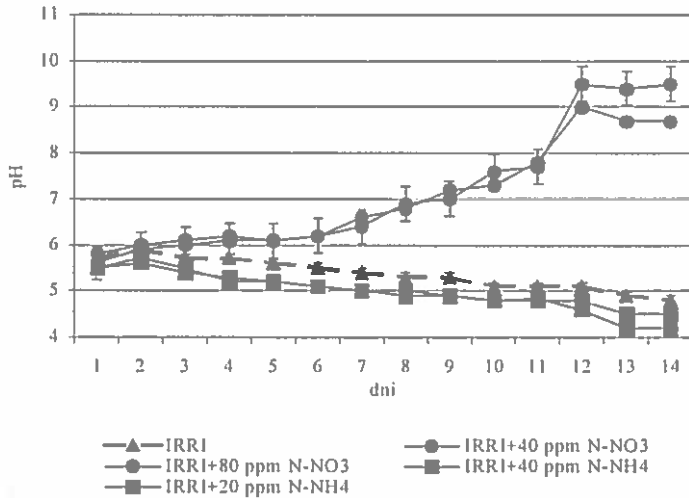
Rys. 1. Dynamika potencjału oksydoredukcyjnego (Eh) w kombinacji kontrolnej (IRRI) oraz z dodatkiem azotanów w różnych dawkach w obecności *Azolla filiculoides* Lam.

Fig. 1. Change of redox potential (Eh) in the nutrient solution (IRRI = control) and with the add of different nitrates doses in the presence of the growing fern.



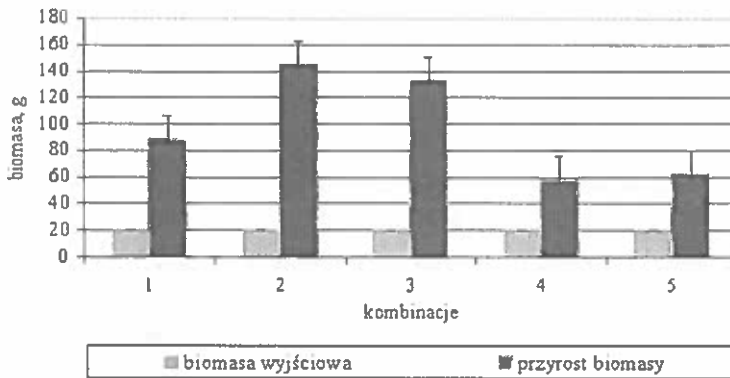
Rys. 2. Dynamika potencjału redoks (Eh) w kombinacji kontrolnej (IRRI) i z dodatkiem azotu amonowego.

Fig. 2. Change of redox potential (Eh) in the nutrient solution (IRRI = control), and with N-NH₄.



Rys. 3. Dynamika pH w pożywkach różnych kombinacji w obecności *Azolla filiculoides* Lam.

Fig. 3. Change of pH of nutrient solution in different regimes in the presence of *Azolla filiculoides* Lam.



Rys. 4. Przyrost biomasy *Azolla filiculoides* Lam.: 1 – IRR1 (kontrolna); 2 – IRR1 + 40 ppm N-NO₃; 3 – IRR1 + 80 ppm N-NO₃; 4 – IRR1 + 40 ppm N-NH₄; 5 – IRR1 + 20 ppm N-NH₄. Biomasa wyjściowa wynosiła 20 g. Uwzględniono błąd standardowy.

Fig. 4. The biomass growth of *Azolla filiculoides* Lam. in the different regimes: 1 – IRR1 (control); 2 – IRR1 + 40 ppm N-NO₃; 3 – IRR1 + 80 ppm N-NO₃; 4 – IRR1 + 40 ppm N-NH₄; 5 – IRR1 + 20 ppm N-NH₄. The bar shows the standard error.

Tabela 1 przedstawia skład pożywki kontrolnej sporządzonej według zalecenia IRRI, zaś w Tabeli 2 wykazano zmianę (Δ) parametrów podłoża w trakcie eksperymentu.

W literaturze dosyć obszernie można znaleźć wiadomości na temat aktywności nitrogenazy w *Azolla-Anabaena azollae* [2, 3, 8,] oraz optymalnego fotoperiodu i temperatury wzrostu [6, 7, 10], wpływu Azolli na pH gleby i dostępności składników pokarmowych [12]. Stwierdzono również, że źródło zewnętrzne azotu wpływa na wzrost Azolli [9], brak jest natomiast danych dotyczących oddziaływanie Azolli na stan oksydoredukcyjny podłoża.

W przeprowadzonych badaniach wykazano stabilizację Eh w warunkach pożywki IRRI przez okres 14 dni hodowli Azolli, nawet z niewielkim jego wzrostem wynoszącym 35 mV, świadczące o bardzo korzystnym doborze składników, buforujących układ redoks w tym okresie.

Obecność formy amonowej nie oddziałująco na wartość Eh, powoduje zachowanie się Eh pożywki analogiczne jak w kontroli. Obserwowane zmiany odczynu pożywki na koniec doświadczenia, od wartości wyjściowej lekko kwaśnej (pH = 5,8) do wyraźnie kwaśnej (pH = 4,1–4,2) w kombinacjach z formą amonową oraz zdecydowanie alkalicznej (pH = 8,8–9,5) w kombinacjach z dodanymi azotanami, wyraźnie potwierdzają koncepcję wyrównywania ładunków, kiedy w trakcie pobierania jonów przez korzeni to, w zamian NH_4^+ wydzielany jest jon H^+ , a na miejsce NO_3^- jon OH^- .

Zróznicowany przyrost biomasy Azolli świadczy o dużej jej wrażliwości na dostępność i rodzaj formy azotu w podłożu. Żyjąc symbiotycznie z sinicą *Anabaena* wykorzystuje wiązany przez nią azot i powiększa ponad trzykrotnie biomasa w ciągu 14 dni. Dodanie dodatkowe łatwo dostępnych azotanów stymuluje wzrost Azolli, szczególnie znacząco w dawce 40 ppm N- NO_3 w podłożu, powodując ponad 6-krotny jej przyrost. Podwójna dawka N- NO_3 w pożywce nie zwiększa już przyrostu a nawet zauważono 17% jego obniżenie. Zupełnie odmienne zachowanie obserwowano, gdy dostępne w podłożu formy amonowe oddziaływały hamująco na rozwój paprotki, zmniejszając o 40% przyrost biomasy w porównaniu z paprotką kontrolną, równocześnie prowadząc do silnego zakwaszenia środowiska.

Wprowadzenie form utlenionych w postaci azotanów na poziomie 40 i 80 ppm nie wpływa stabilizująco na wartości Eh w okresie dłuższym niż 6 dni, powodując jego obniżenie, obserwowane szczególnie po upływie 10 dni hodowli.

Jak wynika z Tabeli 2 różne formy azotu przyswajane są odmiennie przez *Azollę*, co jest zgodny z badaniami Liu [7].

Wpływ zatem potencjału redoks (Eh) na przyrost biomasy przy stosowaniu poszczególnych form azotu, jest najbardziej korzystny w granicach od 550 do 600 mV w pożywce zawierającej N-NO₃, gdy przy tych wartościach Eh obecność N-NH₄ w stężeniu 40–80 ppm wydaje się ograniczać wzrost paprotki, co prawdopodobnie świadczy pośrednio o malejącej aktywności enzymu nitrogenazy w obecności azotu amonowego.

WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań laboratoryjnych z hodowlą *Azolli* stwierdzono, że wartości potencjału redoks w zakresie od 550 mV do 600 mV są optymalne dla produkcji jej biomasy. Obniżenie potencjału oksydoredukcyjnego nastąpiło po 6 dniu hodowli *Azolli* w kombinacji z pożywką IRR1 wzbogaconej w azotany zarówno w stężeniu 40 jak i 80 ppm.

Jak wynikało z badań, stabilizacja Eh na poziomie ok. 600 mV wystąpiła w pożywkach kontrolnej i w kontrolnej z dodatkiem form amonowych, zarówno przy 20 jak i 40 ppm N-NH₄. Po 14 dniach hodowli wystąpiło obniżenie wartości pH w kombinacji kontrolnej od 5,8 do 4,8 oraz wzbogaconej azotem amonowym od 5,5 do 4,2 oraz w kombinacji zawierającej formy azotu azotanowego, zarówno przy 80 jak i 40 ppm N-NO₃, odpowiednio do 8,8 i 9,5 a przyrost biomasy był prawie dwukrotnie większy w kombinacji z podłożem wzbogaconym w azotany i stanowił zaledwie 60% kontroli w podłożu zawierającym formę amonową.

PODZIĘKOWANIA

Do badań wykorzystano rośliny *Azolla filiculoides* Lam. udostępnione dzięki uprzejmości Dyrekcji Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Warszawskiego. Za to autor serdecznie składa podziękowania.

PIŚMIENNICTWO

1. Ashton P. J., Walmsley R. D.: The aquatic fern *Azolla* and its *Anabaena* symbiont. *Endeavour* 35, 39–43, 1976.
2. Galal Y.G.M.: Estimation of nitrogen fixation in an *Azolla*-rice association using the nitrogen-15 isotope dilution technique. *Biol. Fert. Soils*, 24, 76–80, 1997.

3. Giller K.E., Wilson K.F.: Wetland rice: Cyanobacteria, Azolla and green manures. In: Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems, 103–117, ed. CAB International, 1993.
4. Gliński J., Stępniewski W.: Soil Aeration and Its Role for Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985.
5. Kotowska U.: Oznaczanie form azotu przy użyciu analizatora FIAsar 5010 firmy TECATOR. IX Szkoła „Fizyka z elementami agrofizyki”, PAN Instytut Agrofizyki, Lublin, 1997.
6. Laurawiczenie T.W., Jakunin A.F., Gogotow I.N.: Wpływ temperatury i fotoperiodu na wzrost i wiązanie azotu przez Azolla. Fiziologia Rastieni, 37, 3, 457–461, 1990.
7. Liu Zhong-Zhu i inni.: Preliminary study on some physiological aspects of Azolla. Scientia Agricultura Sinica, 2, 63–70, 1979.
8. Peters G.A., Meeks J.C.: The Azolla-Anabaena symbiosis: basic biology, Annu. Rev. Plant Mol. Biol., 40, 193–210, 1989.
9. Peters G.A., Tois R.E., Evans W.R., Crist D.K., Mayne B.C., Poole R.E.: Characterization and comparisons of five N₂-fixing Azolla-Anabaena associations. I. Optimization of growth conditions for biomass increase and N content in a controlled environment. Plant Cell Environ., 3, 2, 261, 1980.
10. Watanabe I., Berja N.S.: The growth of four species of Azolla as affected by temperature. Aquatic Botany, 15, 2, 175, 1983.
11. Watanabe I., Roger P.A., Ladha, Van Hove C.: Biofertilizer Germoplasm Collections at IRRI, IRRI, Manila 1992.
12. You C.B., Li J.W., Song W.: Effect of nitrogen sources on some physiological characteristics of Azolla. In: „Proceedings of Symposium on Paddy Soil”, Academia Sinica, 719–725, 1981.

INFLUENCE OF NITROGEN FORMS ON REDOX POTENTIAL OF THE NUTRIENT SOLUTION AND BIOMASS OF *AZOLLA FILICULOIDES* LAM

R. P. Bennicelli^{1,2}

¹ Department of Biochemistry and Environmental Chemistry,

Catholic University of Lublin al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin, Poland

² Institute of Agrophysics PAS, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27 Poland

Summary: *Azolla filiculoides* Lam. is a floating water fern. It has the ability to fix atmospheric nitrogen through symbiosis with blue green algae *Anabaena*, therefore, it is considered an important potential source of nitrogen as green manure. *Azolla* stimulated many studies in all over the world. Knowledge of the physiological and ecological factors influencing the growth of the fern is therefore essential in order to enhance the *azolla* practical application. The greenhouse study described in this paper aimed to evaluate and quantify the influence of different forms of nitrogen on redox potential (Eh) of the solution and *Azolla* biomass. An optimal redox potential range for growth of *Azolla* (550–600 mV) was found, and a privileged uptake of nitrate from nutrient solution versus atmosphere fixed nitrogen was observed.

Keywords: *anabaena*, *azolla*, biomass, redox potential (Eh).