

Beata Smolińska*, Krystyna Cedzyńska*

**AMYLAZY JAKO ZWIĄZKI WSPOMAGAJĄCE FITOEKSTRAKCJĘ
RTEŃCI Z GLEBY**

**AMYLASES – THE COMPOUNDS WHICH ENHANCE MERCURY
PHYTOEXTRACTION**

Słowa kluczowe: fitoekstrakcja wspomagana, rtęć, *Lepidium sativum*, amylazy.

Key words: enhanced phytoextraction, mercury, *Lepidium sativum*, amylases.

*The aim of the study was to compare the accumulation of mercury by garden cress (*Lepidium sativum*) after soil pollution by inorganic mercury compounds ($HgCl_2$; $Hg(NO_3)_2$ and $HgSO_4$) in different concentrations, as well as efficiency of the phytoextraction process before and after application of synthetic enzyme α -amylase, as the substance, which enhance the process.*

The investigation shows that garden cress accumulated mercury from soil. The accumulation depended on mercury salt used for soil pollution and it was on the level 8.5% for soil pollution by $Hg(NO_3)_2$, and even 17.8% for soil pollution by 2 ppm $HgCl_2$. The higher mercury concentration in soil, the lower mercury accumulation by the plant. Mercury was mostly accumulated in the roots of the plant (about 90.0% of total mercury accumulation), which means that mercury translocation among plant tissues was limited.

For process conducted with α -amylase application the efficiency increased about 5.0%. In this variant of process the translocation of pollutants to shoots of the plant was not limited. The aboveground part of the plants consisted 15.5% of Hg for soil pollution by 20 ppm of $Hg(NO_3)_2$, and 18.0% for soil pollution by 2 ppm of $HgCl_2$. The mercury concentration in leaves of garden cress increased in some cases even twice.

* *Dr inż. Beata Smolińska i prof. dr hab. Krystyna Cedzyńska – Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; tel.: 42 631 34 16; fax: 42 636 28 60; e-mail: beata.smolinska@p.lodz.pl*

1. WPROWADZENIE

W wyniku rozwoju cywilizacji, a przede wszystkim powszechnej chemizacji różnorodnych aspektów życia, równowaga ekologiczna w przyrodzie i gospodarce uległa zakłóceniu. Gwałtowny rozwój większości gałęzi przemysłu i energetyki, wzrost populacji, masowy napływ ludności do miast, zwiększenie zapotrzebowania na żywność, wzrost liczby samochodów, coraz większe ilości nowych związków chemicznych stosowanych w gospodarstwach domowych, budownictwie, przemyśle, rolnictwie i innych dziedzinach, spowodowały nasilenie zanieczyszczenia i degradacji środowiska naturalnego [Kabata-Pendias, Pendias 1999].

Jednym z najważniejszych odnawialnych bogactw naturalnych Ziemi i podstawą funkcjonowania wszystkich istniejących na niej obecnie ekosystemów lądowych, są gleby. Będąc zewnętrzną, powierzchniową warstwą litosfery są one w najwyższym stopniu narażone na degradację [Buczkowski, Kondzielski, Szamański 2002]. Spośród substancji mających negatywny wpływ na środowisko wyróżnić należy rtęć. Chociaż metal ten występuje w niewielkich ilościach, stanowi poważne zagrożenie dla organizmów. Nie ulega biodegradacji i dlatego bardzo długo utrzymuje się w środowisku [Gambuś, Gorlach 2001].

Gleby zanieczyszczone i zdegradowane utraciły częściowo lub całkowicie swoje pierwotne właściwości fizykochemiczne i funkcje biologiczne. Nagłą potrzebą staje się w takich wypadkach podjęcie działań zmierzających do detoksykacji i oczyszczenia zanieczyszczonych i zdegradowanych gleb.

Istnieje wiele metod rekultywacji skażonych gleb. Wśród nich wyróżnić można metody fizyczne (odmywanie, sortowanie, ekstrakcja), chemiczne (utlenianie-redukcja, dehalogenacja, ekstrakcja, hydroliza, regulacja pH), termiczne (desorpcja termiczna, spalanie, zeszklenie) i biologiczne. Metody biologiczne opierają się na biologicznej aktywności organizmów żywych, m.in. roślin wyższych, które mają zdolność do immobilizacji lub usuwania z zanieczyszczonej gleby nagromadzonych w niej zanieczyszczeń [Gworek 2004]. Taka metoda nazywana jest fitoremediacją i umożliwia usuwanie z gleb różnego rodzaju zanieczyszczeń, zarówno organicznych, jak i nieorganicznych, w tym metali ciężkich. Jest metodą stosunkowo młodą, obiecującą, znajdującą coraz więcej zastosowań [Buczkowski, Kondzielski, Szamański 2002].

Jedną z technik stosowanych do oczyszczania gleb zanieczyszczonych rtęcią, jest fitoekstrakcja. W procesie tym wykorzystywane są rośliny wyższe do pobierania zanieczyszczeń z gleby, ich translokacji do pędów i akumulacji [Sillanpaa, Ramo 2001]. Problemem pojawiającym się przy tego typu procesie jest niska biodostępność metali. W celu zwiększenia rozpuszczalności tych związków w roztworze glebowym, a co za tym idzie, zwiększenia ich fitoprzyswajalności, do gleby wprowadzane są substancje, np. edta [Sillanpaa, Ramo 2001; Yahua, Xiangolong, Zhenguo 2004].

Celem pracy było porównanie akumulacji rțęci przez rzeżuchę ogrodową (*Lepidium sativum*) po zanieczyszczeniu gleby nieorganicznymi związkami rțęci (HgCl_2 ; $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ i HgSO_4) w różnych stężeniach oraz porównanie efektywności procesu fitoekstrakcji rțęci przed i po zastosowaniu syntetycznego enzymu α -amylazy, jako substancji wspomagającej proces.

Przeprowadzone badania dowodzą, że rzeżucha ogrodowa akumulowała rțęć z gleby. W zależności od soli użytej do skażenia gleby, rzeżucha ogrodowa akumulowała od 8,5% rțęci w razie skażenia $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, nawet do 17,8-procentowej zawartości rțęci (skażenie 2 ppm HgCl_2) znajdującej się w glebie, przy czym w miarę wzrostu koncentracji rțęci w glebie, akumulacja w roślinie była mniejsza. Najwyższą koncentrację metalu odnotowano jednak w korzeniach rośliny (ok. 90,0% całkowitego stężenia Hg w roślinie), co wskazuje na ograniczenie translokacji rțęci do części nadziemnych rośliny.

Aplikacja α -amylazy spowodowała wzrost efektywności procesu fitoekstrakcji o ok. 5,0%. W procesie, w którym zastosowano dodatek α -amylazy wzrósł transport rțęci do nadziemnych części rzeżuchy ogrodowej. Zielone części rośliny zawierały od 15,5% rțęci w razie skażenia 20 ppm $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ do nawet 18,0% przy skażeniu gleby 2 ppm HgCl_2 . Koncentracja rțęci w liściach rośliny wzrosła w niektórych wypadkach nawet dwukrotnie.

Prezentowane w niniejszym opracowaniu badania miały na celu sprawdzenie możliwości zastosowania rzeżuchy ogrodowej w procesie fitoekstrakcji rțęci z gleby oraz porównanie efektywności procesu przed i po zastosowaniu syntetycznego enzymu α -amylazy, jako substancji wspomagającej proces.

2. METODYKA BADAŃ

2.1. Gleba

Gleba poddana analizie pochodziła z ogródków działkowych znajdujących się na terenie Łodzi. Do badań pobrano glebę z warstwy o głębokości 0 – 30 cm [Lityński, Jurkowska, Golbach 1976]. Po osiągnięciu przez glebę powietrznie suchej masy zbite części warstwy mineralnej roztarto w moździerzu, a następnie przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm [Ostrowska, Gawiński, Szczubińska 1991]. W glebie oznaczono odczyn (w H_2O) oraz zawartości:

- węgla organicznego metodą Tiurina;
- azotu ogółem metodą Kiejdahla [Brehmer, Mulvaney 1982];
- fosforu metodą Bray'a dla gleb kwaśnych [Bray, Kurtz 1945];
- wybranych metali metodą AAS po ekstrakcji 2n HNO_3 (Merck);
- rțęci metodą CV-AAS po ekstrakcji 2n HNO_3 (Merck);
- amylaz z zastosowaniem metody Somogyi-Nelsona na cukry redukujące [Somogyi 1967];

Gleba została umieszczona w donicach i skażona nieorganicznymi solami rțęci: HgCl_2 , HgSO_4 , $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (Merck), w stężeniach 2, 10 i 20 mg soli na 1 kg suchej masy gleby.

Do gleby zaaplikowano syntetyczny enzym α -amylazę (z *Bacillus subtilis* ~ 5 U/mg (Fluka AG) w stężeniu 0,5 mg/1 kg s.m. gleby.

2.2. Roślina

Ze względu na krótki okres wegetacji oraz zdolność do magazynowania rtęci pobranej z gleby [Maila, Cloete 2002; Robinson i in. 2003] do procesu fitoekstrakcji użyto pieprzycę siewną (*Lepidium sativum*), zwaną zwyczajowo rzeżuchą ogrodową. Do uprawy rzeżuchy ogrodowej zastosowano donicę glinianą o pojemności 1,5 litra. W donicy umieszczono 1 kg gleby, następnie posiano 10 g nasion, pochodzących z firmy Grono, Wrocław. Uprawę prowadzono w warunkach naturalnego oświetlenia, w systemie dziennie-nocnym, w temperaturze pokojowej (ok. + 20°C), zachowując stałą wilgotność podłoża (ok. 40%). Za optymalny czas hodowli rośliny uznano 10 dób.

Uprawę roślin prowadzono na glebie niezanieczyszczonej rtęcią (próba kontrolna), na glebie skażonej rtęcią (różne sole użyte do skażenia w różnych stężeniach) oraz na glebie, do której oprócz soli rtęci, dodano syntetyczny enzym α -amylazę.

Stężenie rtęci w roślinie oznaczono zgodnie z metodą CV-AAS, po wcześniejszej mineralizacji materiału roślinnego. Mineralizację rośliny przeprowadzono według procedur opublikowanych przez Cavallini i innych [1999].

2.3. Eksperymenty

Proces fitoekstrakcji był prowadzony na glebie z dodatkiem HgCl_2 , HgSO_4 , $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, w stężeniach 2, 10 i 20 mg soli na 1 kg suchej masy gleby. Stężenia rtęci w poszczególnych częściach rośliny (korzenie, łodygi, liście), przy różnych wariantach skażenia gleby, porównano.

W celu oznaczenia wpływu enzymu α -amylazy na proces fitoekstrakcji rtęci z gleby, homogeniczne próbki glebowe zostały umieszczone w donicach, do których oprócz soli rtęci dodano α -amylazę. Stężenia rtęci w poszczególnych częściach rośliny zostały porównane.

Gleba z dodatkiem α -amylazy (niezanieczyszczona rtęcią) została użyta do określenia toksyczności syntetycznego enzymu na roślinę. We wszystkich wariantach prowadzonego doświadczenia oznaczono aktywność α -amylazy.

3. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Przeprowadzone badania dotyczyły oznaczenia wybranych parametrów glebowych, które umożliwiły późniejsze ustalenie optymalnych warunków procesu fitoekstrakcji. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane parametry gleby (wynik średni \pm odchylenie standardowe)

Table 1. Chosen soil properties (mean \pm standard deviation)

Parametry glebowe	Stężenie
pH (H ₂ O)	6,45
C _{organiczny} [g·kg ⁻¹ suchej masy gleby]	5,47 \pm 0,02
N _{całkowity} [g·kg ⁻¹ suchej masy gleby]	0,52 \pm 0,03
P [g·kg ⁻¹ suchej masy gleby]	0,38 \pm 0,01
Hg [mg·kg ⁻¹ suchej masy gleby]	nie wykryto
Cu [mg·kg ⁻¹ suchej masy gleby]	0,023 \pm 0,003
Zn [mg·kg ⁻¹ suchej masy gleby]	0,074 \pm 0,010
Co [mg·kg ⁻¹ suchej masy gleby]	0,007 \pm 0,002
α -amylaza [mg Glu·kg ⁻¹ suchej masy gleby·ha ⁻¹]	0,761 \pm 0,025

Pierwszy etap prowadzonego doświadczenia polegał na oznaczeniu akumulacji rtęci przez korzenie, łodygi i liście rzeżuchy ogrodowej oraz jej porównaniu dla uprawy roślin w różnych warunkach skażenia gleby. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Akumulacja rtęci(II) w różnych częściach rzeżuchy ogrodowej (wynik średni \pm odchylenie standardowe)

Table 2. Accumulation of Hg(II) by garden cress (means \pm standard deviations)

Związek Hg użyty do skażenia gleby	Stężenie Hg w glebie [mg·kg ⁻¹]	Stężenie Hg w roślinie [mg·kg ⁻¹ s.m.]		
		korzenie	łodygi	liście
HgCl ₂	2	0,312 \pm 0,005	0,032 \pm 0,004	0,012 \pm 0,005
	10	1,120 \pm 0,013	0,064 \pm 0,012	0,032 \pm 0,003
	20	1,682 \pm 0,025	0,082 \pm 0,003	0,040 \pm 0,004
HgSO ₄	2	0,301 \pm 0,012	0,024 \pm 0,004	0,010 \pm 0,001
	10	1,100 \pm 0,011	0,060 \pm 0,003	0,030 \pm 0,002
	20	1,675 \pm 0,004	0,076 \pm 0,004	0,036 \pm 0,003
Hg(NO ₃) ₂	2	0,285 \pm 0,004	0,024 \pm 0,004	0,010 \pm 0,002
	10	1,087 \pm 0,003	0,060 \pm 0,005	0,030 \pm 0,002
	20	1,666 \pm 0,009	0,072 \pm 0,003	0,036 \pm 0,001

Przeprowadzone badania dowodzą, że rzeżucha akumulowała duże ilości rtęci znajdującej się w glebie. Pobieranie rtęci przez roślinę było jednak uzależnione od formy, w jakiej metal został wprowadzony do gleby. Największą akumulację rtęci odnotowano w odniesieniu do skażenia gleby HgCl₂. Zwiększony pobór polutanta wprowadzonego do gleby w postaci chlorku można tłumaczyć udziałem tego jonu w procesach życiowych rośliny. Jony chlorkowe pełnią bardzo ważną funkcję w procesie fotosyntezy, stymulują aktywność niektórych enzymów oraz uczestniczą w procesie osmoregulacji komórek [Kopcewicz, Lewak 2000]. Większa toksyczność charakteryzowała rtęć wprowadzoną do gleby w postaci siarczynu. Chociaż siarczan (SO₄²⁻) stanowi główną formę siarki, jaką rośliny mogą pobierać z podłoża, siarczan rtęci (II) znajdujący się w glebie okazał się być związkiem o większej toksyczności niż toksyczność HgCl₂. Spowodowane to było silnym połączeniem rtęci z siar-

ką, co przyczyniło się do zmniejszenia poboru tego związku z gleby. Najniższą koncentrację Hg^{2+} w rzeźusze zaobserwowano przy skażeniu gleby $Hg(NO_3)_2$.

Wykonane analizy wskazują, że rtęć była głównie akumulowana w korzeniach rośliny (ok. 90% całkowitego stężenia Hg w roślinie). Korzenie, których biomasa może stanowić ok. 20–50% biomasy całej rośliny, ekstrahują z gleby i dostarczają do pędów większość jonów znajdujących się w glebie. Rtęć wraz ze składnikami odżywczymi została pobrana z gleby. Mechanizm pobierania rtęci przez komórki korzeni opiera się na pasywnej adsorpcji na powierzchni ścian komórkowych rośliny i dyfuzji toksycznych jonów przez przestrzenie międzykomórkowe, występujące w komórkach roślinnych [Savenstrand, Strid 2004]. W momencie przeniknięcia przez ścianę i błonę komórkową korzeni do cytoplazmy, jony Hg zaczynają stanowić czynnik zakłócający procesy życiowe zachodzące w roślinie. Aby temu zapobiec, u roślin wykształciło się wiele reakcji obronnych umożliwiających przeciwdziałanie wnikaniu zbędnych pierwiastków, m.in. rtęci, do komórek [Baranowska-Morek 2003]. Wynikiem działania tych mechanizmów był ograniczony transport rtęci do nadziemnych części rośliny.

Przeprowadzone analizy pozwalają stwierdzić, że rzeżucha ogrodowa, w zależności od soli użytej do skażenia gleby, akumulowała od 8,5% rtęci przy skażeniu gleby $Hg_2(NO_3)_2$ do nawet 17,8% rtęci znajdującej się w glebie przy skażeniu 2 ppm $HgCl_2$, przy czym w miarę wzrostu koncentracji rtęci w glebie akumulacja w roślinie była mniejsza.

W celu określenia wpływu α -amylazy na proces fitoekstrakcji rtęci z gleby przez rzeżuchę ogrodową początkowo oznaczono aktywności tego enzymu w skażonej glebie. Aby możliwa była ocena wpływu skażenia gleby rtęcią na aktywność α -amylazy w 10 dobie (okres zbioru plonów po uprawie rzeżuchy ogrodowej), analizy przeprowadzono w ciągu 0–15 dni. Wyniki tych analiz przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Aktywność α -amylazy w glebie w zależności od związku użytego do skażenia gleby i jego stężenia (wynik średni \pm odchylenie standardowe)

Table 3. Activity of α -amylase in soil polluted by different mercury compound in different concentration (mean \pm standard deviation)

Skażenie gleby		Aktywność α -amylazy [mg Glu · kg s.m. gleby ⁻¹ · ha ⁻¹]			
Związek rtęci	Stężenie [ppm]	1 doba po skażeniu	5 dób po skażeniu	10 dób po skażeniu	15 dób po skażeniu
$HgCl_2$	2	0,732 \pm 0,011	0,643 \pm 0,012	0,427 \pm 0,010	0,385 \pm 0,002
	10	0,682 \pm 0,005	0,600 \pm 0,014	0,393 \pm 0,005	0,360 \pm 0,012
	20	0,645 \pm 0,003	0,565 \pm 0,015	0,321 \pm 0,011	0,306 \pm 0,010
$Hg(NO_3)_2$	2	0,725 \pm 0,012	0,640 \pm 0,003	0,420 \pm 0,015	0,382 \pm 0,015
	10	0,680 \pm 0,106	0,600 \pm 0,008	0,382 \pm 0,003	0,357 \pm 0,002
	20	0,638 \pm 0,002	0,567 \pm 0,012	0,315 \pm 0,004	0,297 \pm 0,004
$HgSO_4$	2	0,728 \pm 0,012	0,639 \pm 0,012	0,422 \pm 0,012	0,379 \pm 0,015
	10	0,685 \pm 0,016	0,600 \pm 0,012	0,385 \pm 0,012	0,355 \pm 0,010
	20	0,655 \pm 0,002	0,562 \pm 0,007	0,320 \pm 0,010	0,302 \pm 0,005

Na podstawie wykonanych badań można stwierdzić, że niezależnie od związku użytego do skażenia gleby i jego stężenia rtęć powoduje obniżenie aktywności α -amylazy w glebie. Przyczyną takiego zjawiska jest duża wrażliwość bakterii glebowych na wszystkie połączenia tego metalu, co objawia się inhibicją enzymu wytwarzanego przez mikroorganizmy zamieszkujące środowisko glebowe, a tym samym sprzyja obniżeniu aktywności biologicznej badanej ziemi.

Kolejnym etapem badań było oznaczenie akumulacji rtęci w roślinie po dodaniu do gleby syntetycznego enzymu α -amylazy. Wyniki dotyczące tego procesu przedstawiono w tabeli 4.

Jednym z założeń pracy było określenie zdolności magazynowania i transportowania rtęci przez rzeżuchę ogrodową po wzroście aktywności α -amylazy z gleby. W celu zwiększenia fitoprzyzwajalności rtęci oraz ułatwienia transportu zanieczyszczeń akumulowanych w komórkach rzeżuchy ogrodowej wprowadzono do gleby enzymy. Enzym, w postaci związku chemicznego, otrzymany z bakterii *Bacillus subtilis*, użyto w najmniejszym stężeniu, mającym wpływ na prowadzony proces. Po aplikacji syntetycznego enzymu, oznaczono stężenie rtęci w roślinie oraz stężenie α -amylazy po procesie. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Akumulacja rtęci przez rzeżuchę ogrodową po dodatku do gleby α -amylazy (wynik średni \pm odchylenie standardowe)

Table 4. Accumulation of Hg by garden cress after application of α -amylazy (mean \pm standard deviation)

Skażenie gleby		Stężenie rtęci w roślinie [mg/kg s.m.]			Aktywność α -amylazy [mg Glu/kg s.m. gleby·ha]
związek rtęci	stężenie [ppm]	korzeń	łodyga	liście	
HgCl ₂	2	0,309 \pm 0,002	0,044 \pm 0,002	0,024 \pm 0,002	0,656 \pm 0,002
	10	1,050 \pm 0,001	0,150 \pm 0,001	0,083 \pm 0,001	0,543 \pm 0,003
	20	1,550 \pm 0,011	0,222 \pm 0,003	0,121 \pm 0,001	0,520 \pm 0,001
Hg(NO ₃) ₂	2	0,276 \pm 0,002	0,040 \pm 0,002	0,021 \pm 0,002	0,631 \pm 0,001
	10	1,015 \pm 0,013	0,146 \pm 0,003	0,079 \pm 0,001	0,520 \pm 0,006
	20	1,535 \pm 0,001	0,212 \pm 0,002	0,118 \pm 0,001	0,500 \pm 0,005
HgSO ₄	2	0,291 \pm 0,003	0,042 \pm 0,004	0,022 \pm 0,001	0,640 \pm 0,003
	10	1,028 \pm 0,002	0,146 \pm 0,002	0,080 \pm 0,002	0,532 \pm 0,003
	20	1,542 \pm 0,005	0,216 \pm 0,001	0,120 \pm 0,001	0,515 \pm 0,001

Na podstawie danych przedstawionych w tabeli 4 można zauważyć, że rzeżucha uprawiana na glebie wzbogaconej dodatkiem amylazy z *Bacillus subtilis*, akumulowała duże ilości rtęci zanieczyszczającej glebę. Dodatek enzymu spowodował wzrost koncentracji metalu w komórkach roślinnych.

α -amylaza jest enzymem dość powszechnie występującym w środowisku glebowym. Jest to enzym wydzielany pozakomórkowo przez wiele mikroorganizmów, dzięki któremu

zachodzi hydroliza skrobi (rozpad wiązań α -1,4-glikozydowych) [Gianfreda, Rao 2004]. Enzym ten zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, zawiera dwie grupy sulfhydrylowe, tworzące dwa mostki disiarczkowe, stabilizowany jest przez Ca^{2+} i Cl^- . Grupy sulfhydrylowe aminokwasów tworzących enzymy (cysteina, cystyna i metionina), są najczęściej wbudowane w centra aktywne białek oraz biorą udział w kształtowaniu struktury drugo- i trzeciorzędowej białka, zatem mają znaczenie przy działaniu katalitycznym enzymów [Kączkowski 1999].

Rtęć wykazuje silną reaktywność w stosunku do siarki. Poprzez połączenie polutanta z siarką występującą w α -amylazie w postaci grup sulfhydrylowych pochodzących od cysteiny, rtęć utworzyła związek kompleksowy z enzymem, co spowodowało obniżenie jej toksyczności. Z danych literaturowych [Steer, Levitzki 1973] wynika, że dwie grupy sulfhydrylowe, które występują w α -amylazie, są ułożone blisko siebie. Rtęć może wypierać z nich atomy wodoru i tworzyć „pochodne” mostków disiarczkowych ($-\text{S}-\text{Hg}-\text{S}$) w odniesieniu do Hg^{2+} . Niezależnie jednak od sposobu połączenia metalu z siarką, białko enzymatyczne traci swoją aktywność.

Z punktu widzenia fitoekstrakcji wspomaganej istotne jest, że rtęć tworząca wiązania z siarką obecną w cysteinie, zmniejsza swoją toksyczność w stosunku do rośliny, i jako związek kompleksowy z białkiem, jest łatwiej przez nią przyswajalna.

Przeprowadzone badania wskazują, że dodatek α -amylazy do gleby spowodował wzrost akumulacji rtęci przez rzeżuchę. Stężenie rtęci w roślinie było uzależnione od soli metalu użytej do skażenia gleby i jej stężenia. Największą koncentrację rtęci w komórkach rzeżuchy ogrodowej odnotowano przy skażeniu gleby HgCl_2 . Przy skażeniu gleby 2 ppm soli zawierającej rtęć, akumulacja pierwiastka w roślinie była największa.

Aplikacja amylazy spowodowała wzrost koncentracji rtęci w komórkach rośliny użytej do procesu fitoekstrakcji. Wzrost akumulacji, w zależności od związku użytego do skażenia gleby, wahał się w granicach 0,4–1,0% w porównaniu z akumulacją rtęci z gleby bez dodatku α -amylazy.

Dodatek α -amylazy do gleby umożliwił transport rtęci do nadziemnych części rzeżuchy ogrodowej. Zielone części rośliny zawierały nawet 18% przy skażeniu gleby HgCl_2 . Koncentracja rtęci w liściach rośliny zwiększyła się w niektórych wypadkach nawet dwukrotnie.

Po procesie fitoekstrakcji gleby skażonej nieorganicznymi związkami rtęci aktywność α -amylazy uległa zmniejszeniu i wynosiła od 0,510 do 0,660 $\text{mg Glu} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m. gleby} \cdot \text{ha}^{-1}$, zależnie od soli rtęci użytej do skażenia gleby i jej stężenia, jednak nadal była wysoka. Zatem rtęć obecna w glebie nie spowodowała całkowitej inhibicji enzymu.

Użyty w doświadczeniu enzym, nie spowodował zmniejszenia biomasy rośliny.

4. WNIOSKI

Przeprowadzone badania umożliwiają stwierdzenie, że aplikacja syntetycznego enzymu α -amylazy do gleby, spowodowała wzrost koncentracji rżęci w komórkach roślinnych. Ponadto połączenie rżęci z grupami sulfhydrylowymi α -amylazy umożliwiło lepszą translokację metalu w częściach nadziemnych rżęczy, co było bardzo istotne ze względu na proces fitoekstrakcji.

Niniejsza praca dowodzi, że na proces fitoekstrakcji rżęci z gleby, zachodzący przy udziale rżęczy ogrodowej, wpływ mają enzymy glebowe (np. α -amylaza). Dodatek gleby odznaczającej się wysoką aktywnością tego enzymu do gleby zanieczyszczonej rżęcią zwiększa efektywność oczyszczania gleby z rżęci.

PIŚMIENICTWO

- BARANOWSKA-MOREK A. 2003. Roślinne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich. Kosmos. Problemy nauk biologicznych 52: 283–298.
- BRAY R.H., KURTZ L.T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. The Soil Science 59: 39–45.
- BREMMER J.M., MULVANEY C.S. 1982. Nitrogen-total. In: Page A.L. et al.: Methods of soil analysis Part 2: Chemical and microbiological properties. ASA Monograph Nr 9: 595–624.
- BUCZKOWSKI R., KONDZIELSKI I., SZAMAŃSKI T. 2002. Metody remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń: 67–95.
- CAVALLINI A., NATALI L., DURANTE M., MASERTI B. 1999. Mercury uptake, distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) plants. The Science of total environment 243/244: 119–127.
- GAMBUŚ F., GORLACH E. 2001. Problemy zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi: Pochodzenie i szkodliwość metali ciężkich. Aura – Ochrona Środowiska 6:11–13.
- GIANFREDA L., RAO M.A. 2004. Potencial of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils. Enzyme and Microbial Technology 35: 339–354.
- GWOREK B. Praca zbiorowa 2004. Technologie rekultywacji gleb. Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa: 9–10; 77–94.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych; PWN, Warszawa: 170–183.
- KĄCZKOWSKI J. 1999. Podstawy biochemii. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa: 86–90.
- KOPCEWICZ J., LEWAK S. 2002. Fizjologia roślin. PWN, Warszawa: 228–245.
- LITYŃSKI T., JURKOWSKA H., GOLBACH E. 1976. Analiza chemiczno-rolnicza. PWN, Warszawa: 15, 69.

- MAILA M., CLOETE T. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50: 107–113.
- OSTROWSKA A., GAWLIŃSKI S., SZCZUBIŁKA Z. 1991. Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin. Katalog. IOŚ, Warszawa: 220–221.
- ROBINSON B., DUWIG C., BORAN N., KANNAULASAN M., SARAVANAN A. 2003. Uptake of arsenic by New Zealand watercress (*Lepidium sativum*). *The Science of the Total Environment* 301: 67–73.
- SAVENSTRAND H., STRID A. 2004. Six genes strongly regulated by mercury in *Pisum sativum* roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 135–142.
- SILLANPAA M., RAMO J. 2001. Adsorption of metal-ethylenediaminetetraacetic acid chelates onto lake sediments. *Chemosphere* 45: 881–885.
- SOMOGYI M. 1967. Notes on sugar determination. *Journal of Biology and Chemistry* 195: 19–23.
- STEER M., LEVITZKI A. 1973. The metal specificity of mammalian α -amylase revealed by enzyme activity and structural probes. *FEBS Letters* 31: 339–354.
- YAHUA C., XIANGOLONG L., ZHENGUO S. 2004. Leaching and uptaking of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere* 57: 187–196.