

ROMUALD CZERPAK, ALICJA PIOTROWSKA

*Zakład Biochemii Roślin
Instytut Biologii
Uniwersytet w Białymstoku
Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok
e-mail: alicjap@uwb.edu.pl*

WOLFFIA ARRHIZA – NAJMNIEJSZA ROŚLINA NACZYNIOWA O NAJWIĘKSZYCH MOŻLIWOŚCIACH ADAPTACJI I ZASTOSOWANIA

WSTĘP

Wolffia bezkorzeniowa należy do rodziny rzęśowatych (Lemnaceae). Najczęściej zasiedla płytkie zbiorniki wodne, dobrze nasłonecznione, osłonięte od wiatru oraz zasobne w substancje mineralne i organiczne. Wolffia pochodzi z krajów tropikalnych, ale dzięki wysokiej odporności na niekorzystne warunki środowiska (wahania temperatury i pH, zanieczyszczenia chemiczne) w ostatnich latach stwierdza się coraz więcej stanowisk jej występowania w Polsce. W zależności od warunków troficznych środowiska tj.: zawartości związków mineralnych i organicznych oraz natężenia światła, może odżywiać się wyłącznie autotroficznie poprzez fotosyntezę,

całkowicie heterotroficznie lub miksotroficznie (jednocześnie auto- i heterotroficznie). W warunkach naszego klimatu wolffia rozmnaża się szybko, wyłącznie wegetatywnie poprzez pączkowanie. Dzięki dużym zdolnościom detoksykacyjnym i heterotroficznym z powodzeniem może być wykorzystana w roślinnych oczyszczalniach ścieków typu „Lemna”. Dotychczas dość dobrze została poznana budowa morfologiczno-anatomiczna i wymagania środowiskowe wolffii, natomiast wiedza o procesach biochemiczno-fizjologicznych składających się na jej metabolizm jest dość słabo udokumentowana.

BUDOWA ORAZ ROZMNAŻANIE SIĘ WOLFFII BEZKORZENIOWEJ

Wolffia bezkorzeniowa (*Wolffia arrhiza*) (L.) Wimm. to najmniejsza roślina kwiatowa, która należy do rodziny rzęśowatych (CRAWFORD i LANDOLT 1995). Wyróżnia się trzy formy życiowe wolffii: wegetatywne człony pędowe pływające, wegetatywne człony zanurzone w wodzie oraz formy przetrwalne (zimujące), zwane turionami. Formy wegetatywne pływające i zanurzone posiadają elipsoidalny kształt o rozmiarach: długość 1,5 mm, szerokość 1 mm, wysokość 1,3 mm. Organizm wolffii nie wykazuje zróżnicowania na korzenie, łodygę i liście, co sprawia, że bardziej przypomina plechowate glony niż rośliny wyższe (Ryc. 1A). Jej ciało pokrywa jed-

nowarstwowa skórka (epiderma) z licznymi aparatami szparkowymi. Wewnątrz znajduje się miękisz asymilacyjny (fotosyntezujący), w którym obecne są liczne komory powietrzne. Warstwę miękiszu, zlokalizowaną bezpośrednio pod skórą, budują drobne, cienkościenne komórki bogate w chloroplasty i ziarna skrobiowe o średnicy 5 μm . W centralnej części pędu miękisz składa się z dużych komórek o małej ilości chloroplastów i dużych ziarnach skrobi (średnica około 11 μm). Między komórkami miękiszu tworzą się duże przestrzenie wypełnione powietrzem. Wolffia aktywnie reguluje zawartość O_2 , N_2 i CO_2 w komorach powietrznych, dzięki

temu swobodnie przemieszcza się pionowo w toni wodnej, odpowiednio do zmieniających się warunków środowiska (ANDERSON i współaut. 1973, LANDOLT i KANDELER 1987, LES i współaut. 1997).

W okresie jesienno-zimowym wolfia opada na dno zbiorników wodnych w postaci turionów (formy przetrwalne), gdzie w stanie spoczynku ogranicza tempo metabolizmu do skrajnego minimum. Turiony występują pojedynczo i są kształtu prawie kulistego o wymiarach $0,5 \times 0,4$ mm. Struktura anatomiczna turionów jest podobna do członów wegetatywnych. W obrębie miększu (parenchymy) wyróżniamy dwie warstwy komórek, które są szczelnie wypełnione dużymi ziarnami skrobi o średnicy około $14 \mu\text{m}$. Aparaty szparkowe w skórcie są zamknięte (CELIŃSKI 1954; GODZIEMBA-CZYŻ 1969, 1970; ANDERSON i współaut. 1973; LES i współaut. 1997, WHITE i WISE 1998).

W strefie tropikalnej i subtropikalnej wolfia głównie rozmnaża się płciowo. Wytwarza rozdzielnopłciowe, silnie zredukowane, mi-

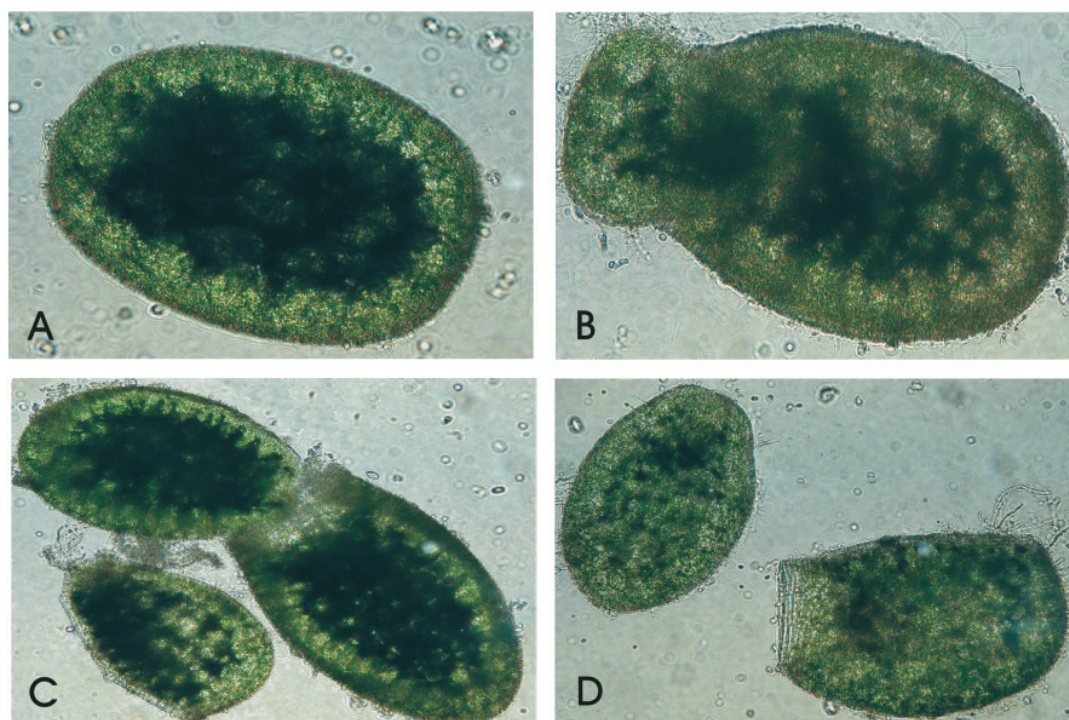
kroskopijnej wielkości kwiaty – żeński w postaci pojedynczego słupka oraz męskie w postaci dwóch pręcików. Kwitnie po ośmiu dniach od rozpoczęcia rozwoju wegetatywnego. Kuliste ziarna pyłku o średnicy około $20 \mu\text{m}$ są zaopatrzone w haczyki (LANDOLT i KANDELER 1987).

Natomiast w naszym klimacie wolfia rozmnaża się wyłącznie wegetatywnie poprzez pączkowanie, wytwarzając pączki potomne, a wewnątrz nich prapotonne kolejnych rzędów (Ryc. 1B, C, D). Najmniejsze z nich mogą zawierać tylko 20–25 komórek. Wegetatywne rozmnażanie pozwala na zachowanie stałego genotypu i szybkiego namnożenia się roślin w sprzyjających warunkach środowiska. Przez pewien czas pączki potomne znajdują się w torebce rozrodczej i za pomocą wydłużonego trzoneczka są przyłączone do organizmu macierzystego. Torebka rozrodcza dla młodych roślin spełnia funkcję ochronną, między innymi przed atakiem patogenów (GODZIEMBA-CZYŻ 1969).

WYSTĘPOWANIE I WARUNKI ŻYCIA WOLFII BEZKORZENIOWEJ

Wolffia arrhiza pochodzi z tropikalnych i subtropikalnych rejonów Azji i Afryki. Spo-

tykana jest także w Australii oraz krajach południowej Europy (Włochy, Francja). Zasięg



Ryc. 1. *Wolffia bezkorzeniowa*.

A – budowa anatomiczna. B, C, D – kolejne etapy jej pączkowania (zdjęcie mikroskopowe, powiększenie 125 razy).

występowania tej rośliny coraz bardziej się zwiększa, bowiem pojawiają się stanowiska w Europie Środkowej i Północnej (Niemcy, Holandia, Belgia, Francja, Polska). Pierwsze stanowiska wolffii w Polsce stwierdzono w połowie ubiegłego stulecia w zachodniej części kraju, gdzie warunki klimatyczne są najłagodniejsze i najbardziej korzystne do wzrostu i rozwoju tej rośliny. W ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się stopniowe ocieplenie klimatu, co umożliwiło jej dotarcie nawet do chłodnych terenów Puszczy Białowieskiej i Suwalszczyzny (CELIŃSKI 1954, SAMOSIEJ i KUCHARSKI 1986, FALKOWSKI 1999).

Wolffia zasiedla przeważnie małe, osłonięte od wiatru i dobrze nagrzane zbiorniki eutroficzne, chociaż może występować także w wodach mezo- i oligotroficznymi. W Polsce najczęściej spotyka się ją w zarastających stawach, sadzawkach, starorzeczach, dołach potorfowych, a nawet kwaśnych (humusowych) śródleśnych młakach. Jest to roślina pionierska, ekspansywna, będąca jednocześnie wskaźnikiem eutrofizacji wód. Jako typowy organizm pleustonowy występuje samodzielnie lub wchodzi w skład zbiorowisk z rzęsą, spirodelą, makrofitami lub roślinami

szuwarowymi. Duże skupiska wolffii spotyka się także w sąsiedztwie wierzb, rosnących nad zbiornikami wodnymi (SAMOSIEJ i KUCHARSKI 1986, ŚWIĄDER 1993, FALKOWSKI 1999).

W wodach, gdzie fotosynteza jest utrudniona, czyli zacienionych, zarośniętych kożuchem rzęsy lub innymi roślinami wodnymi oraz zasobnych w związki organiczne, wolffia łatwo się aklimatyzuje. W ten sposób przystosowuje się do ograniczonego dostępu światła i zmienia typ odżywiania z autotroficznego na mikso- lub heterotroficzny. Optymalna temperatura dla życia wolffii to 26–28°C, maksymalna 30–31°C, a minimalna 13–15°C. Spadek temperatury do –2°C powoduje obumarcie członów pędowych wegetatywnych w ciągu 4–5 dni, natomiast turiony giną po 20 dniach. Wolffia jest bardzo odporna na obniżenie zawartości wody w biomasy, np. członów wegetatywnych tolerują spadek zawartości wody o 80% biomasy. Letalny deficyt wody wynosi 93%, zaś dla turionów 73,5%. Dzięki temu wolffia jest w stanie przeżyć okresowe wysychanie zbiorników wodnych (FRICK 1994; FRICK i MORLEY 1995; MICAL i współaut. 1999, 2002).

SKŁAD CHEMICZNY WOLFFII BEZKORZENIOWEJ

Wolffia charakteryzuje się dużą zawartością białek, które stanowią średnio 40–50% biomasy członów wegetatywnych, natomiast sumaryczna zawartość kwasów nukleinowych (DNA i RNA) kształtuje się na poziomie 5,2–7,2 mg/g biomasy (BHANTHUMNAVIN i MCGARRY 1971). Akumulacja cukrów redukujących w komórkach wolffii jest bardzo niska i wynosi 157–391 µg/g biomasy. Mechanizmy metabolizmu cukrów u wolffii nie zostały dotychczas poznane. Z badań FRICKA (1994) wiadomo, że komórki wolffii charakteryzują się wysoką zawartością puli węglowodanów zapasowych, bowiem 19% świeżej masy członów pędowych stanowi skrobia. U turionów (formy zimujące) skrobia zajmuje aż połowę biomasy. Dzięki temu formy przetrwalne pomimo, że są nawet pięciokrotnie mniejsze od członów wegetatywnych, mają prawie kulisty kształt, większą zawartość suchej masy i wyższy ciężar właściwy niż formy pływające. Pozwala to na swobodne opadanie na dno zbiorników (FUJITA i współaut. 1999, MICAL i KROTKE 1999, MICAL i współaut. 2000, KROTKE 2002).

Intensywność fotosyntezy netto świadczy o aktualnym typie odżywiania się roślin: auto-, mikso- lub heterotroficznym. Tempo fotosyntezy form wegetatywnych wolffii hodowanych na pożywkach mineralnych wynosi przeciętnie 50–95 ml O₂/h/g biomasy, w zależności od natężenia promieniowania fotosyntetycznego czynnego (KROTKE 2002). Turiony charakteryzują się ponad 2-krotnie niższym tempem wymiany gazowej. Podobne różnice w intensywności fotosyntezy u różnych form życiowych stwierdzono także u spirodeli, przy czym najniższe tempo wymiany gazowej zanotowano u form przetrwalnych zagrzebanych w osadach dennych błotnistych zbiorników wodnych (GODZIEMBA-CZYŻ 1970).

Zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofili i karotenoidów) w biomasy wolffii przedstawia Tabela 1 (CZERPAK i współaut. 2002, CZERPAK i SZAMREJ 2003). Główną funkcją chlorofili jest absorbowanie fotonów i dostarczanie elektronów do fosforylacji fotosyntetycznej. Karotenoidy wspomagają proces fotosyntezy poszerzając zakres długości

fal wychwytywanego promieniowania, chronią aparat fotosyntetyczny przed fotooksydacją i szkodliwym działaniem ultrafioletu oraz neutralizują substancje toksyczne. Komórki wulfii charakteryzują się dużą zawartością tych barwników, co umożliwia jej wzrost w warunkach niedostatecznego oświetlenia oraz obecności trucizn mineralnych i organicznych (WEJNAR i WEJNAR 1991).

U wulfii stwierdzono również wysoką zawartość kilku flawonoidów w postaci wolnej i związanych z glukozą m.in.: orientyny, homoorientyny, wiceniny i saponeretyny (MCC LURE i ALSTON 1966). Flawony te są charakterystyczne dla kryptochromów absorbujących światło o różnej długości fal. Światło poprzez system fitochromowy działa stymulująco na przepuszczalność błon komórkowych, aktywność pomp jonowych, syntezę i aktywność enzymów, np. reduktazy azotanowej, biosyntezę białek, chlorofili, kwasów nukleinowych. Prawdopodobnie dzięki obecności systemu fitochromowego wulfia posiada zdolność amonifikacji azotanów i wykorzystania ich na potrzeby własnego metabolizmu (MICAL i KROTKE 1998).

Wulfia bezkorzeniowa jest cennym źródłem steroidowych hormonów płciowych i kortykosteroidów. Badania przeprowadzone przez MICAL i współaut. (2000) wykazały obecność w dużych ilościach steroidowych hormonów płciowych: estradiolu (w granicach 18–55 pg/g biomasy) i testosteronu (0,23–0,6 ng/g biomasy). Spośród kortykosteroidów stwierdzono występowanie: kor-

tyzolu (0,3–0,5 µg/g biomasy) oraz 17-α-hydroksyprogesteronu (0,2–0,9 µg/g biomasy). Hormony steroidowe u zwierząt stymulują procesy anaboliczne oraz wzrost biomasy, zwłaszcza mięśni i zawartych w nich białek. Prawdopodobnie dzięki temu ryby akwariowe karmione wulfią szybciej rosną i dojrzewają (MICAL i PŁONOWSKI 2002). U roślin hormony te stymulują kiełkowanie nasion, wzrost i rozwój zarodka, syntezę białek, kwasów nukleinowych, chlorofili i ATP (ŚLAMA 1980). Kortykosteroidy pobudzają procesy energetyczne oraz biorą udział w reakcjach obronnych organizmu na czynniki stresowe, co prawdopodobnie ułatwia wulfii w adaptacji do zmieniających się warunków środowiska w naszym klimacie.

Stwierdzono także obecność u wulfii zwierzęcych hormonów: folikulotropiny (0,26–0,32 mIU/g biomasy), luteotropiny (0,2 mIU/g biomasy), tyreotropiny (0,12–0,14 µIU/g biomasy) i trijodotyroniny (2,30–2,44 µg/g biomasy). Rola tych hormonów u roślin nie została dotychczas poznana, natomiast u zwierząt są niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju (MICAL i współaut. 2000).

Komórki wulfii bogate są również w witaminę B₁₂. Jej zawartość kształtuje się w granicy 3–4 µg/g biomasy, co około 35-krotnie przekracza prawidłowe stężenie w surowicy ludzkiej. Witamina ta zazwyczaj nie występuje u roślin naczyniowych. U ssaków witamina B₁₂ jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu procesów krwiotwórczych i erytropoezy. W komórkach wulfii pełni prawdopodobnie funkcję detoksykacyjną wiążąc atomy metali ciężkich, co pozwala na jej normalny wzrost w środowisku zanieczyszczonym metalami ciężkimi (FACIUS i współaut. 1996, MICAL i KROTKE 1998).

Tabela 2 przedstawia ilościową zawartość podstawowych pierwiastków: magnezu, wapnia, żelaza, miedzi, cynku ołowiu i chromu

Tabela 1. Zawartość barwników fotosyntetycznych w biomacie wulfii bezkorzeniowej.

Barwniki	µg/g biomasy
chlorofil <i>a</i>	49–112
chlorofil <i>b</i>	16–33
sumaryczna zawartość chlorofili (<i>a+b</i>)	65–145
sumaryczna zawartość karotenoidów	43,3–90,7
β-karoten	8,6–22,3
sumaryczna zawartość ksantofili	34,7–68,4
alloksantyna	0,3–1,1
luteina+zeaksantyna (ksantofile ubogie w tlen, zawierające 1–2 atomy tlenu w cząsteczce)	19,9–48,6
neoksantyna+wiolaksantyna (ksantofile bogate w tlen, zawierające 3–4 atomy tlenu w cząsteczce)	14,5–18,7

Tabela 2. Zawartość wybranych metali w biomacie *Wolffia arrhiza*.

Nazwa metalu	Zawartość w kg biomasy
Mg	73,5–80,6 mg/kg
Ca	338–427 mg/kg
Fe	12–32 µg/kg
Cu	7,5–10,6 µg/kg
Zn	2,1–3,5 µg/kg
Pb	5,8–7,8 µg/kg
Cr	0,4–2,1 µg/kg

w biomasie wolfii hodowanej na pożywcę mineralnej (KROTKE 2002). Szczególnie duża kumulacja magnezu, wapnia, żelaza i miedzi w wolfii może okazać się ważnym argumen-

tem przy ewentualnym wykorzystaniu rośliny jako dodatku do paszy dla bydła przy zapobieganiu anemii czy białaczki.

HETEROTROFIZM WOLFII BEZKORZENIOWEJ I PRAKTYCZNE JEJ WYKORZYSTANIE

FRICK (1994) oraz FRICK i MORLEY (1995) badali możliwości przyswajania i metabolizowania cukrów, galaktozy, sorbitolu, laktozy i sacharozy, przez gatunki należące do Lemnaceae: *Lemna minor*, *Wolffia brasiliensis* i *Spirodela punctata*. Okazało się, że rośliny te zarówno w ciemności, jak i na świetle wykorzystują do odżywiania się sacharozę, natomiast nie tolerują laktozy, galaktozy i sorbitolu. Z kolei, heterotroficzne mutanty *Lemna gibba*, pozbawione barwników fotosyntezujących, oraz osobniki uszkodzone, posiadające tkankę kalusową mogą przyswajać wszystkie wymienione cukry. *Lemna minor* z tkanką kalusową, odżywia się laktozą z serwatki mleka oraz galaktozą, która jest produktem hydrolizy laktozy. Duża zdolność heterotrofii laktozowej u *L. minor* z kalusem jest związana ze wzrostem syntezy i wzmożoną aktywnością enzymów metabolizujących laktozę i galaktozę, tj. β -galaktozydazy, UDP-galaktozo-pirofosforylasy i izomeryzy powodującej przekształcenie UDP-galaktozy w UDP-glukozę. *L. minor* posiada także zdolność syntezy kwasu L-askorbinowego i szczawiowego z glukozy (SAITO 1996). Wyniki tych badań wskazują na możliwość prowadzenia hodowli roślin z rodziny Lemnaceae na ściekach pochodzących z mleczarni zasobnych w laktozę oraz pozostałe cukry.

W zależności od warunków środowiska rośliny rzęsowate mogą zmieniać typ odżywiania się. W warunkach dostatecznego nasłonecznienia wolfia jest typową rośliną fotosyntezującą. Natomiast przy braku światła w środowisku eutroficznym, bogatym w organiczne związki azotu i fosforu, wolfia bezkorzeniowa zmienia typ odżywiania się na mikso- lub całkowicie heterotroficzny, pobierając ze środowiska substancje organiczne, w tym cukry, które wykorzystuje jako źródło energii i do syntez metabolitów. W ten sposób wolfia przyczynia się do oczyszczenia wód, w których żyje (MICAL i współaut. 1997, 1999, 2000, 2002; MICAL i KROTKE 1998; 1999; WOŹNIAK i ZAWORA 1999; KROTKE 2002).

Tempo rozmnażania i wzrostu wolfii bezkorzeniowej jest bardzo duże w porównaniu z pozostałymi gatunkami z rodziny Lemnaceae, np. wolfia podwaja swoją liczebność już po około 30 dniach, zaś rzęsa dopiero po 60. Dzięki temu intensywnie pobiera biogeny, zwłaszcza azot (około 126 mg N/m²/dobę) i fosfor (średnio 38 mg P/m²/dobę), które wykorzystuje na potrzeby własnego metabolizmu (GODZIEMBA-CZYŻ 1970, LANDOLT i KANDELER 1987, FACIUS i współaut. 1996, MICAL i PŁONOWSKI 2002). Dzięki tym właściwościom wolfia może być stosowana z dobrym skutkiem do usuwania nadmiaru związków organicznych ze wstępnie oczyszczonych ścieków lub zanieczyszczonych wód naturalnych, np. politroficznych jezior. Jednocześnie można ją wykorzystać do produkcji białka na cele paszowe lub jako nawóz (FUJITA i współaut. 1999). W wielu krajach nadmiar rzęsy pochodzącej z oczyszczalni ścieków typu „Lemna” jest wykorzystywany jako karma dla ryb, drobiu, zwłaszcza kaczek, oraz jako cenna komponenta paszowa dla bydła i trzody chlewnej. W niektórych krajach południowo-wschodniej Azji i środkowej Ameryki *Lemna minor* stosowana jest do celów spożywczych jako dodatek do sałatek i zup (BHANTHUNAVIN i MCGARRY 1971, CULLEY i EPPS 1973, EDWARDS i współaut. 1992, FUJITA i współaut. 1999).

Rośliny rzęsowate z rodzaju *Lemna*, *Spirodela* i *Wolffia* od dawna są stosowane w chińskiej, rosyjskiej i arabskiej medycynie ludowej w leczeniu wielu schorzeń, ze względu na zawartość w nich aktywnych terapeutycznie związków chemicznych. W formie naparów, ekstraktów i maceratów stosowane są w chorobach artretyczno-reumatycznych, alergiach, astmie, chorobach nerek i wątroby. Rośliny te wykazują działanie przeciwo-rączkowe, napotne, moczopędne, przeciwzapalne, ściągające i hamujące krwawienie, a w niektórych przypadkach antybakteryjne i przeciwgrzybicze. Dzięki korzystnym oddziaływaniom na organizm człowieka i zwierząt wolfia może więc być powszechnie wy-

korzystywana w ziołolecznictwie, zastępując tradycyjne środki chemiczne, nie powodując przy tym niepożądanych skutków ubocznych

(WEJNAR i WEJNAR 1991; ŚWIĄDER 1993; SAITO 1996; MICAL i współaut. 1999, 2000; MICAL 2002).

OCZYSZCZANIE ŚCIEKÓW PRZEZ WOLFIE BEZKORZENIOWĄ

Badania MICAL i KROTKE (1998, 1999), MICAL i współaut. (2002) oraz KROTKE (2002) wykazały, że wolfia bezkorzeniowa hodowana na ściekach komunalnych Białegostoku rośnie znacznie lepiej niż na wodzie wodociągowej, ubogiej w składniki organiczne, natomiast zasobnej w mineralne. Rośliny są większe, bardziej zielone i na powierzchni ścieków tworzą gęsty, zbity kożuch. Badania mikroskopowe morfologiczno-anatomiczne nie wykazują żadnych różnic u osobników rosnących w wodzie wodociągowej i na ściekach komunalnych. Rozwojowi rośliny nie przeszkadzają obecne w ściekach metale ciężkie i organiczne substancje toksyczne oraz chlorki w stężeniu 3–5 g/dm³. Wolfia już po 14 dniach hodowli na ściekach podwaja swoją liczebność przy jednoczesnym wzroście biomasy o 15–20%. W tych warunkach nietypowo charakteryzuje się także wzrostem o 30% intensywności fotosyntezy i zawartości chlorofilu, niż na wodzie wodociągowej. Wzmoczona biosynteza barwników fotosyntetycznych może być spowodowana dobrym zaopatrzeniem w związki organiczne i mineralne oraz reakcją obronną rośliny na obecność w ściekach substancji toksycznych (np. metali ciężkich).

W wolfii hodowanej na ściekach komunalnych w ciemności nie zachodzi degradacja chlorofilu, mimo całkowitego zahamowania procesu fotosyntezy i przejścia wyłącznie na heterotroficzny tryb życia. Począwszy od 10 aż do 50 dnia hodowli w ciemności stopniowo zwiększa się zawartość kwasów nukleinowych i białek (MICAL i współaut. 1997, 1998). Wolfia rosnąc w ciemności na ściekach wytwarza dwukrotnie więcej białek (do 45 mg/g biomasy), a także prawie trzykrotnie więcej cukrów w porównaniu z rośliną hodowaną na wodzie wodociągowej (KROTKE 2002). Również badania FRICKA (1994) wykazały, że pozostałe rośliny rzęsowate takie jak: *Wolffia brasiliensis*, *Lemna gibba* i *Spirodela punctata*, charakteryzują się większą akumulacją cukrów rosnąc w ciemności na pożywkach bogatych w związki organiczne, niż na świetle. W warunkach oświetlenia zawierają od 100 do 190 mg cukrów na kg

białek, zaś w ciemności aż 2922 mg cukrów na kg białek. Nadmiar cukrów wytwarzanych w fotosyntezie lub pobranych przez wolfię ze środowiska eutroficznego, np. ze ścieków, prawdopodobnie jest na bieżąco przetwarzany na formę zapasową – skrobię (FUJITA i współaut. 1999).

KROTKE (2002) wykazała także prawie 2-krotny wzrost aktywności transketolazy u wolfii rosnącej na ściekach komunalnych. Enzym ten powoduje szybszą regenerację pierwotnego akceptora CO₂, czyli 1,5-difosforybulozy, a więc zwiększa intensywność asymilacji CO₂. Reguluje także reakcje cyklu pentozofosforanowego, niezbędnego do wytwarzania koenzymów, pentoz, które m.in. wchodzi w skład nukleotydów budujących kwasy nukleinowe oraz prekursorów związków fenolowych: aminokwasów aromatycznych i flawonoidów, które u wolfii występują w dużych ilościach (MCCLURE i ALSTON 1966). Wskazuje to na wysokie tempo metabolizmu cukrów i syntezy związków pięciowęglowych u wolfii rosnącej na ściekach.

W komórkach wolfii bezkorzeniowej hodowanej na ściekach obserwuje się również wzrost zawartości jonów metali: ołowiu, chromu, miedzi, niklu, żelaza, wapnia i magnezu, natomiast koncentracja jonów cynku i kadmu w biomasie ulega zmniejszeniu. Metale te nie wykazują toksycznego wpływu na wzrost i metabolizm wolfii, prawdopodobnie dzięki syntezie fitochelatyn i chelatującemu działaniu metaloporfiryn: chlorofilu i witaminy B₁₂, której duże ilości stwierdzono w jej biomasie zarówno podczas hodowli na ściekach, jak i na wodzie wodociągowej (MICAL i współaut. 1999, 2000).

W ściekach, na których hodowano wolfię, już po 14 dniach eksperymentu stwierdza się obniżenie o około 60% zawartości azotu ogólnego i o ponad 70% fosforu. Również dużemu zmniejszeniu ulega zawartość tłuszczu (około 80%), metali ciężkich (ołowiu, chromu, miedzi), osadu organicznego, a także następuje redukcja deficytu tlenowego (wskaźniki BZT₅ i ChZT). Powoduje to poprawę utlenienia środowiska, zwiększa możliwości wzrostu i rozwoju innych organi-

zmów wodnych, uczestniczących w procesie oczyszczania ścieków. Przyczynia się także do zwiększenia różnorodności i liczebności planktonu: bakterii, pierwotniaków, skąposzczetów i małżoraczków (MICAL i PŁONOWSKI 2002). Należy podkreślić, że wolfia charakteryzuje się wyższą skutecznością w oczyszczaniu ścieków (redukowaniu zawartości tłuszczu, azotu całkowitego i zawiesin ogólnych), niż pozostałe gatunki Lemnaceae (KROTKIE 2002).

Intensywny wzrost i rozmnażanie się wolffii bezkorzeniowej na ściekach surowych, pobieranie przez nią związków organicznych i metali ciężkich nie tylko na ich powierzch-

ni, ale i w głębszych warstwach przyczynia się znacznie do ich oczyszczania i zwiększenia klarowności. Dotychczasowe badania MICAL i współaut. (1997, 1999, 2000) wykazały, że wolfia bezkorzeniowa hodowana w polskich warunkach klimatycznych może być z powodzeniem wykorzystana w roślinnych oczyszczalniach ścieków, zwłaszcza miejskich i wiejskich obejmujących od kilku do kilkunastu domów jednorodzinnych. Natomiast nadmiar biomasy wolffii może służyć jako nawóz lub cenny dodatek do pasz, bogaty w witaminy, mikroelementy, białka, skrobię i hormony zwierzęce o działaniu anabolicznym.

ODDZIAŁYWANIE WYBRANYCH HORMONÓW NA WOLFIĘ BEZKORZENIOWĄ

Prowadzono również badania dotyczące wpływu regulatorów wzrostu i rozwoju roślin na biochemizm wolffii bezkorzeniowej. Miało to na celu poznanie aktywności metabolicznej hormonów u miksotroficznej rośliny naczyniowej oraz znalezienie takich czynników chemicznych, za pomocą których można byłoby selektywnie kierować wzrostem i rozwojem wolffii, aby zintensyfikować jej hodowlę dla celów praktycznych, np. w roślinnych oczyszczalniach ścieków.

Cytokininy są hormonami roślinnymi, które inicjują podziały komórkowe roślin naczyniowych, glonów, bakterii i grzybów, opóźniają procesy starzenia się oraz wywierają duży wpływ aktywujący na procesy biochemiczno-fizjologiczne, przeważnie o charakterze anabolicznym. Cytokininy: benzyloaminopuryna, kinetyna oraz 1,3-difenylo-mocznik, indukują prawie 2-krotny wzrost zawartości białek i monosacharydów (cukrów prostych) w biomase wolffii, w porównaniu z kontrolą. Zaobserwowano również wzrost zawartości kwasów nukleinowych (DNA i RNA) o 30% pod wpływem cytokinin. Stosowane fitohormony natomiast nie wykazują znaczącego wpływu na zawartość barwników fotosyntetycznych: chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów. Wolfia reaguje nieco słabiej na stosowane cytokininy w odniesieniu do innych roślin naczyniowych, typowych fotoautotrofów, prawdopodobnie dzięki silnie rozwiniętym możliwościom miksotroficznego odżywiania się, niższą wrażliwością na w/w czynnik hormonalny oraz być może szybkim tempem pobierania, metabolizowania i degradacji cytokinin (PIOTROWSKA i współaut. 2005).

Badano także zmiany w zawartości wybranych metabolitów pod wpływem hormonów steroidowych płciowych (β -estradiolu i testosteronu) oraz kortykosteroidów: kortyzonu, kortyzolu, prednizolonu i 11-deoksykortykosteronu, których obecność stwierdzono w komórkach wolffii (CZERPAK i SZAMREJ 2003, SZAMREJ i CZERPAK 2004). Hormony te u roślin naczyniowych pobudzają kiełkowanie nasion, wzrost i rozwój roślin, kwitnienie oraz intensywność fotosyntezy. Uzyskane wyniki wskazują, że hormony steroidowe płciowe o 80% indukują wzrost akumulacji kwasów nukleinowych i białek, w stosunku do hodowli kontrolnej. β -estradiol i testosteron także efektywniej w porównaniu z kortykosteroidami zwiększają zawartość barwników fotosyntetycznych: chlorofilu, ksantofilu ubogich w tlen oraz karotenów. Z kolei na zawartość cukrów redukujących najsilniejszy wpływ wykazują kortykosteroidy, które zwiększają ich ilość prawie 2-krotnie, w porównaniu z β -estradiolem i testosteronem. Hormony steroidowe płciowe wykazują u wolffii bezkorzeniowej wysoką aktywność biochemiczną, stymulując głównie procesy replikacji, transkrypcji, translacji i akumulację barwników fotosyntetycznych. Natomiast kortykosteroidy w organizmie wolffii działają w dużym stopniu analogicznie jak u zwierząt, zwiększając zawartość cukrów w komórkach i indukując tzw. efekt hiperglikemiczny.

Auksyny takie jak: IAA (kwas 3-indolilooctowy), NAA (kwas 2-naftylooctowy) i PAA (kwas fenylooctowy), posiadają stymulujący wpływ na wzrost i podziały komórek, biosyntezę białek i ATP, fotosyntezę, aktywny

transport metabolitów przez błony komórkowe. W porównaniu do typowych roślin fotosyntezujących, auksyny stosowane u wolfii w znacznie mniejszym stopniu stymulowały zawartość podstawowych metabolitów tj.: DNA i RNA, białek, chlorofili *a* i *b*, ogólną pulę karotenoidów, cukrów redukujących i intensywność fotosyntezy. Nietypowo, najsilniej pobudzająco działała auksyna syntetyczna – PAA, w porównaniu z IAA, auksyną powszechnie występującą u roślin, zazwyczaj wykazującą najsilniejszy efekt stymulujący na metabolizm komórek roślinnych. Najsłabszy wpływ na zawartość analizowanych metabolitów u wolfii bezkorzeniowej miał NAA. Ten nietypowy efekt stymulującego działania PAA, w porównaniu z IAA i NAA, może być spowodowany silnie rozwiniętym heterotrofizmem wolfii oraz większą odpornością chemicznych analogów auksyn na procesy degradacji i koniugacji, które zachodzą u roślin (CZERPAK i współaut. 2002, 2004).

Kwas salicylowy (SA) stymuluje kwitnienie roślin, alternatywną oksydazę niewrażliwą na cyjanki, oddychanie komórkowe, inicjuje wzrost temperatury podczas kwitnienia roślin termogenicznych oraz indukuje syntezę białek odpornościowych w wyniku ataku różnorodnych patogenów. W biomasie wolfii SA przeciętnie 2-krotnie zwiększa akumulację DNA i RNA, cukrów redukujących oraz prawie 1,5-krotnie – sumaryczną zawartość chlorofili *a* i *b*, karotenoidów i białek. Podwyższa także tempo fotosyntezy netto o 50% w porównaniu z kontrolą. Wyniki tych badań potwierdzają obserwacje fitosocjologiczne, wskazujące, że *Wolffia arrhiza* chętnie zasiedla zbiorniki wodne, gdzie na brzegach rosną wierzby (*Salix sp.*), które wytwarzają i wydzielają do środowiska wodnego znaczne ilości kwasu salicylowego (CZERPAK i współaut. 2002, 2003).

PODSUMOWANIE

Wolffia bezkorzeniowa (*Wolffia arrhiza*) należy do rodziny rzęśowatych. Charakteryzuje się dużą ekspansywnością dzięki czemu jej zasięg występowania na świecie i w Polsce coraz bardziej powiększa się. Pod względem morfologiczno-anatomicznym to roślina nietypowa, w której brak jest większości organów i tkanek. W naszym klimacie rozmnaża się przez pączkowanie. W okresie późnojesiennym i zimowym, przekształca się w formy przetrwalne zwane turionami, które opadają na dno zbiorników wodnych. Wolffia charakteryzuje się dużą odpornością na działanie czynników niekorzystnych i stresowych środowiska wahaniami temperatury, metale ciężkie, cyjanki.

Dotychczasowe badania wskazują na duże możliwości wykorzystania zdolności heterotroficznych tej rośliny do oczyszczania ścieków komunalnych miejskich i wiejskich oraz pochodzących z mleczarni zasobnych w aminokwasy, białka i cukry, które są łatwo przyswajalne przez wolfię. Na ściekach wolfia bardzo dobrze rośnie, rozmnaża się oraz akumuluje duże ilości cukrów, białek, barwników fotosyntetycznych i metali ciężkich. Pod wpływem wolfii następuje znaczne oczyszczenie ścieków z substancji organicznych i mineralnych oraz poprawa ich klarowności i utlenialności.

Skład chemiczny *Wolffia arrhiza* mimo, że nie jest dokładnie poznany, charakteryzuje się dużą zawartością białek (40-50%) w członach wegetatywnych i taką samą ilością skrobi w turionach oraz dużą różnorodnością składników mineralnych. Poza tym wolfia jest bogatym źródłem witamin, zwłaszcza B₁₂ i hormonów głównie steroidowych, które aktywują procesy anaboliczne, np. syntezę białek. Dzięki temu zwierzęta karmione paszą z dodatkiem wolfii, takie jak: ryby, kaczki, bydło i trzoda chlewna, zwiększają masę mięśniową. W niektórych krajach Azji, Afryki i Ameryki rośliny rzęśowate, w tym także wolfia, stosowane są jako dodatek kulinarny, a także w medycynie ludowej.

Z dotychczasowych badań dotyczących wpływu niektórych hormonów na biochemizm wolfii, wynika że roślina ta reaguje w sposób nietypowy, w porównaniu do typowych fotoautotroficznych roślin naczyniowych i glonów – zielenic. Prawdopodobnie uwarunkowane to jest silnie rozwiniętym heterotrofizmem. Spośród badanych auksyn najsilniej stymulująco na zawartość metabolitów działa syntetyczny kwas fenyllooctowy. Kwas salicylowy jako główny przedstawiciel fenolokwasów także wpływa pobudzająco na akumulację białek, kwasów nukleinowych, cukrów oraz chlorofili i intensywność foto-

syntezy netto. Badane cytokiny charakteryzują się słabszym oddziaływaniem na zawartość podstawowych metabolitów w wolffii. Z kolei, spośród stosowanych steroidowych hormonów na akumulację kwasów nukleinowych i białek najsilniej stymulująco działa β -estradiol i testosteron. Natomiast na akumulację cukrów, analogicznie jak w przypadku komórek zwierzęcych, największy wpływ wykazują kortykosteroidy.

W niedalekiej przyszłości wolffia bezkorkowa może być wykorzystana z innymi

gatunkami roślin rzęśowatych i niektórymi przedstawicielami zielenic w roślinnych oczyszczalniach ścieków. Proponuje się stosować ją do produkcji paszy dla zwierząt hodowlanych, zasobnej w białka, skrobię, witaminy, hormony i sole mineralne. Być może znajdzie zastosowanie w biotechnologii do otrzymywania związków aktywnych biologicznie, mających znaczenie w dietetyce, fitoterapii i fitokosmetyce.

WOLFFIA ARRHIZA – THE SMALLEST PLANT WITH THE HIGHEST ADAPTATION ABILITY AND APPLICATIONS

Summary

Wolffia arrhiza from the Lemnaceae genus is the smallest vascular plant, which is very expansive and reproduces intensively by gemmation under conditions of our climate. In Polish waters it is becoming more and more abundant, especially in small and shallow eutrophic reservoirs, rich in organic substances. The *W. arrhiza*'s morphological and anatomical structure underwent a high simplification process due to adaptation to the specific environment conditions. The atypical leaf-like body, called a frond, is a complex of tissues with only little differentiation, therefore the *W. arrhiza*'s organism resembles more the thallophytic algae than vascular plants. In unfavourable environmental conditions, especially in the winter and autumn, the frond changes to a resting form, which is called a turion. The plant is very resistant to the impact of various stress and toxic factors such as: temperature and pH fluctuations, xenobiotic pollution. In environment rich in organic substances, *W. arrhiza* changes a way of feeding from photoautotrophic into heterotrophic. Due to these properties, the plant is used more and more commonly in biotechnology of sewage treatment especially of municipal, agricultural and dairy origin, rich in aminoacids, proteins, sugars, organic nitrogen and phosphorus compounds. The wastes to which *W. arrhiza*'s culture become more easily clarified, the values of BOD₅, COD and organic compounds contents are reduced.

The *W. arrhiza*'s biomass is characterised by high accumulation of proteins (40–50%) in vegetative form (frond), the same amount of starch in tu-

rion and a variety of mineral compounds. Biochemical analysis revealed the occurrence of high level of cyanocobalamin (vitamin B₁₂) and hormones, steroid principally. Therefore it can be used as cattle fodder rich in proteins, starch, vitamins, hormones and mineral salts. *W. arrhiza* also may be taken advantage of in biotechnology to obtain biologically active compounds important for dietetics, phytotherapy and phytocosmetics.

The examination of the effect of some phytohormones on *W. arrhiza* metabolism shows that the plant reacts atypically to phytohormones, in comparison with other vascular plants and algae from Chlorophyceae which is probably due to its heterotrophic properties. Of auxins, the PAA (chemical analogue of IAA) was observed to have the most stimulating activity as compared with other IAA-treated plants. Salicylic acid also showed a strong effect on the plant growth, accumulation of organic components and net photosynthetic rate. The cytokinins, derivatives of adenine and urea, were found to have a stimulating effect on the growth and metabolism of *W. arrhiza* with varying intensity which can be explained by the large difference in their chemical structure. From among steroid hormones tested, β -estradiol and testosterone were shown to have the most stimulating effect on the growth, and content of nucleic acids and protein. On the other hand, the accumulation of monosaccharides was observed under the influence of corticosteroids: cortisone, 11-deoxycorticosterone and cortisole, this being analogous to the effect of these hormones on animal cells.

LITERATURA

- ANDERSON J. L., THOMSON W. W., SWADER J. A., 1973. *Fine structure of Wolffia arrhiza*. Can. J. Bot. 51, 1619–1622.
- BHANTHUMNAVIN K., MCGARRY M., 1971. *Wolffia arrhiza* as a possible source of inexpensive protein. Nature 232, 13–14.
- CELIŃSKI F., 1954. *Najmniejsza roślina kwiatowa (Wolffia arrhiza (L. Wimm.))*. Wszechświat 3–4, 75–79.
- CRAWFORD D. J., LANDOLT E., 1995. *Allozyme, divergence among species of Wolffia (Lemnaceae)*. Plant Syst. Evol. 197, 59–69.
- CULLEY D. D., EPPS E. A., 1973. *Uses of duckweed for waste treatment and animal feed*. J. Water Pollut. Contr. Fed. 45, 337–347.
- CZERPAK R., SZAMREJ I. K., 2003. *The effect of β -estradiol and corticosteroids on chlorophylls and carotenoids content in Wolffia arrhiza (L.) Wimm.*

- (Lemnaceae) growing in municipal Białystok tap water. Pol. J. Environ. Stud. 12, 677–684.
- CZERPAK R., DOBRZYŃ P., KROTKE A., KICIŃSKA E., 2002. The effect of auxins and salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae) growing on media on various trophicities. Pol. J. Environ. Stud. 11, 231–235.
- CZERPAK R., PIOTROWSKA A., KROTKE A., 2003. Metabolic activity of salicylic acid in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. growing in different trophical conditions. Ecohydrol. Hydrobiol. 3, 445–452.
- CZERPAK R., PIOTROWSKA A., KROTKE A., 2004. Biochemical activity of auxins in dependence of their structures in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. Acta Soc. Bot. Pol. 73, 269–275.
- EDWARDS P., HASSAN M. S., CHAO C. H., PACHARAPRAKITI C., 1992. Cultivation of duckweed on septage loaded earthen ponds. Biores. Technol. 40, 109–117.
- FACIUS R., SCHERER K., STRAUCH W., NEVZGODINA L. V., 1996. Mortality and morphological anomalies related to the passage of cosmic heavy ions through the smallest flowering aquatic plant *Wolffia arrhiza*. Adv. Spac. Res. 18, 195–204.
- FALKOWSKI M., 1999. Nowe stanowiska wulfii bezkorzeniowej (*Wolffia arrhiza*) i rzęsy garbatej (*Lemna gibba*) na Podlasiu. Chron. Przyrod. Ojcz. 6, 93–95.
- FRICK H., 1994. Heterotrophy in the Lemnaceae. J. Plant Physiol. 144, 189–193.
- FRICK H., MORLEY K., 1995. Metabolism of lactose by *Lemna minor* (Duckweed). Proc. Biochem. 30, 57–62.
- FUJITA M., MORI K., KODERA T., 1999. Nutrient removal and starch production through cultivation of *Wolffia arrhiza*. J. Biosc. Bioeng. 87, 194–198.
- GODZIEMBA-CZYŻ J., 1969. Characteristic of vegetative and resting forms of *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. I. Growth and dynamics of their mutual transformations. Acta Soc. Bot. Pol. 38, 437–452.
- GODZIEMBA-CZYŻ J., 1970. Characteristic of vegetative and resting forms of *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. II. Anatomy, physical and physiological properties. Acta Soc. Bot. Pol. 39, 421–443.
- KROTKE A., 2002. Biologiczne właściwości wulfii bezkorzeniowej *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. i możliwości jej wykorzystania w roślinnych oczyszczalniach ścieków. Praca doktorska, Toruń.
- LANDOLT E., KANDELER R., 1987. The family of Lemnaceae: a monographic study. Phytochemistry, physiology, application. Monogr. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rubel, Zurich 71.
- LES D. H., LANDOLT E., CRAWFORD D. J., 1997. Systematic of the Lemnaceae (duckweeds): interferences from micromolecular and morphological data. Plant Syst. Evol. 204, 161–177.
- MCCLURE J. W., ALSTON R. E., 1966. A chemotaxonomic study of Lemnaceae. Amer. J. Bot. 53, 849–860.
- MICAL A. H., 2002. *Wolffia bezkorzeniowa* – zapomniany, czy nowy lek hormonalny. Wiad. Ziel. 10, 14–15.
- MICAL A. H., KROTKE A., 1998. *Wolffia bezkorzeniowa* (*Wolffia arrhiza*) w roślinnym oczyszczaniu ścieków. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 58, 423–430.
- MICAL A. H., KROTKE A., 1999. *Wolffia arrhiza* (L.) – small but strong. Acta Hydrobiol. 41 (Suppl.), 165–170.
- MICAL A. H., PŁONOWSKI S., 2002. Związki organiczne w wodach, a rozwój wulfii bezkorzeniowej i hodowla ryb. Acta Agrophys. 70, 271–276.
- MICAL A. H., KROTKE A., ŚWIECICKA I., GRUDZIEN B., 1997. Biologia i możliwości adaptacyjne wulfii bezkorzeniowej. Kosmos 46, 283–290.
- MICAL A. H., KROTKE A., SULEWSKA A., 1999. Physiological and metabolic features of *Wolffia arrhiza* and her practical advantage. Folia Univ. Agric. Stetin 77, 263–266.
- MICAL A. H., KROTKE A., WYSOCKA-CZUBASZEK A., 2000. The occurrence of steroid, protein and amino acid hormones and cyanocobalamin in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae) and potential of its adaptability of various environmental conditions. Acta Hydrobiol. 42, 257–262.
- MICAL A. H., ŚWIECICKA I., GODLEWSKA A., KROTKE A., GRUDZIEN B., 2002. Miksotrofizm wulfii bezkorzeniowej, a oczyszczanie ścieków. Gosp. Wod. 3, 120–122.
- PIOTROWSKA A., CZERPAK R., ADAMOWICZ J., BIEDRZYCKA A., POTOCKA M., 2005. Comparison of stimulatory effect of cytokinins adenine and urea derivatives on the biochemism of *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae). Acta Soc. Bot. Pol. 74, 111–118.
- SAITO K., 1996. Formation of L-ascorbic acid and oxalic acid from D-glucose in *Lemna minor*. Phytochemistry 41, 145–149.
- SAMOSIEJ L., KUCHARSKI L., 1986. *Wolffia arrhiza* i *Wolffietum arrhizae* w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem Kujaw Południowych. Fol. Bot. 4, 29–51.
- ŚLAMA K., 1980. Animal hormones and antihormones in plants. Biochem. Physiol. Pflanzen. 175, 177–193.
- ŚWIADER K., 1993. Rzęsowate – mało znane rośliny lecznicze i użytkowe. Wiad. Ziel. 2, 10–12.
- SZAMREJ I. K., CZERPAK R., 2004. The effect of sex steroids and corticosteroids on the content of soluble proteins, nucleic acids and reducing sugars in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae). Pol. J. Environ. Stud. 13, 565–571.
- WEJNAR R., WEJNAR K., 1991. Studies on photosynthetic pigments in Lemnaceae. Photosynthetica 25, 425–430.
- WHITE S. L., WISE R. R., 1998. Anatomy and ultrastructure of *Wolffia columbiana* and *Wolffia borealis*, two nonvascular aquatic angiosperms. Int. J. Plant Sci. 159, 297–304.
- WOŹNIAK L., ZAWORA P., 1999. Charakterystyka podstawowych parametrów ścieków z oczyszczalni typu *Lemna* oraz perspektywa ich wykorzystania. Folia Univ. Agric. Stetin 77, 399–404.