

ŚRODOWISKO I PRZEMYSŁ

POD RED. G. SCHROEDERA



**CURSIVA
2010**

Recenzent:
dr hab. Zbigniew Rozwadowski

Wydanie I
2010

Cursiva
<http://www.cursiva.pl>

ISBN 978-83-62108-05-3

Spis treści

Książka adresowa

Rozdział I

METALE CIĘŻKIE W WODZIE ORAZ PLECHACH ZIELENICY *ULVA* (*ULVOPHYCEAE*, *CHLOROPHYTA*)

Bogusława Łęska, Michał Ptaszkiewicz, Beata Messyasz, Andrzej Rybak

Rozdział II

CHARAKTERYSTYKA INKRUSTACJI POKRYWAJĄCYCH PLECHY SŁODKOWODNEJ FORMY ZIELENICY *ULVA* (*ULVACEAE*, *CHLOROPHYTA*)

Beata Messyasz, Andrzej Rybak, Bogusława Łęska i Marta Pikoś

Rozdział III

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA NANOTECHNOLOGII W ROLNICTWIE

Piotr Grzesiak, Grzegorz Schroeder

Rozdział IV

UWARUNKOWANIA PRODUKCJI KWASU SIARKOWEGO W INSTALACJACH TYPU METALURGICZNEGO

Piotr Grzesiak

Rozdział V

CHARAKTERYSTYKA EKOLOGICZNA ODPADÓW Z PRODUKCJI KWASU SIARKOWEGO

Joanna Łukaszyk, Piotr Grzesiak

Rozdział VI

BADANIE MOŻLIWOŚCI ODZYSKU SKŁADNIKÓW ZE ZUŻYTYCH KATALIZATORÓW WANADOWYCH I KRYTERIA PROCESOWE

Krzysztof Mazurek, Mieczysław Trypuć, Piotr Grzesiak, Marcin Grobela, Rafał Motała

Rozdział VII

BADANIE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA SKŁADNIKÓW Z ODZYSKU DO PRODUKCJI KATALIZATORA WANADOWEGO

**Piotr Grzesiak, Marcin Grobela, Rafał Motala, Krzysztof Mazurek,
Mieczysław Trypuć**

Rozdział VIII

WSTĘPNE ZAŁOŻENIA TECHNOLOGICZNE PRODUKCJI KATALIZATORA WANADOWEGO NA BAZIE ODZYSKANYCH SKŁADNIKÓW

**Piotr Grzesiak, Marcin Grobela, Rafał Motala, Joanna Łukaszyk,
Krzysztof Mazurek, Mieczysław Trypuć**

Rozdział IX

KRYTERIA KWALIFIKACJI KATALIZATORÓW WYCOFANYCH Z EKSPLOATACJI PRZEMYSŁOWEJ

**Piotr Grzesiak, Joanna Łukaszyk, Marcin Grobela, Rafał Motala,
Krzysztof Mazurek, Mieczysław Trypuć**

Rozdział X

BADANIE WPLYWU CZASU NA SKUTECZNOŚĆ PRACY UKŁADU OSUSZANIA GAZU FABRYKI KWASU SIARKOWEGO

**Piotr Grzesiak, Marcin Grobela, Rafał Motala, Tadeusz Hłyń,
Aleksander Woźniak**

Rozdział XI

BADANIE WPLYWU CZASU PRACY WĘZŁA MYCIA GAZU PROCESOWEGO INSTALACJI TYPU METALURGICZNEGO STOSUJĄCEJ TECHNOLOGIĘ PIECA ZAWIESINOWEGO NA SKUTECZNOŚĆ WYMYWANIA FLUOR

**Piotr Grzesiak, Tadeusz Hłyń, Marcin Grobela, Rafał Motala,
Aleksander Woźniak**

Książka adresowa

dr Marcin Grobela

Instytut Ochrony Roślin PIB
Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska Rolniczego
ul. W. Węgorza 20
60-318 Poznań

prof. dr hab. Piotr Grzesiak

Instytut Ochrony Roślin PIB
Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska Rolniczego
ul. W. Węgorza 20
60-318 Poznań

mgr inż. Tadeusz Hłyń

Instytut Ochrony Roślin
Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska Rolniczego
ul. W. Węgorza 20
60-318 Poznań

dr hab. Bogusława Łęska

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Zakład Chemii Supramolekularnej
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

mgr inż. Joanna Łukaszyk

Instytut Ochrony Roślin PIB
Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska Rolniczego
ul. W. Węgorza 20
60-318 Poznań

dr Krzysztof Mazurek

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń

dr Beata Messyasz

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Instytut Biologii Środowiska
Zakład Hydrobiologii
Umultowska 89
61-614 Poznań

dr Rafał Motała

Instytut Ochrony Roślin PIB
Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska Rolniczego
ul. W. Węgorka 20
60-318 Poznań

mgr Marta Pikosz

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Instytut Biologii Środowiska
Zakład Hydrobiologii
Umultowska 89
61-614 Poznań

mgr Michał Ptaszkiewicz

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Instytut Biologii Środowiska
Zakład Hydrobiologii
Umultowska 89
61-614 Poznań

mgr Andrzej Rybak

Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Instytut Biologii Środowiska
Zakład Hydrobiologii
Umultowska 89
61-614 Poznań

prof. dr hab. Mieczysław Trypuć

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń

mgr inż. Aleksander Woźniak

Instytut Ochrony Roślin
Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska Rolniczego
ul. W. Węgorka 20
60-318 Poznań

Rozdział I

METALE CIĘŻKIE W WODZIE ORAZ PLECHACH ZIELENICY *ULVA* (*ULVOPHYCEAE*, *CHLOROPHYTA*)

Bogusława Łęska¹, Michał Ptaszkiewicz¹, Beata Messyasz², Andrzej Rybak²

¹ Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

² Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Biologii, Instytut Biologii Środowiska, Zakład Hydrobiologii, Umultowska 89, 61-614 Poznań

1. WSTĘP

Głony (algi) mają bardzo szerokie zastosowanie i znaczenie w przyrodzie. Mogą być wskaźnikami zanieczyszczenia wody oraz środowiska w jakim się znajdują. Stanowią często największe źródło biomasy w wodach, szczególnie morskich. Pełnią bardzo ważną funkcję w utrzymaniu równowagi środowiska wodnego a ich obecność jest czynnikiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania ekosystemów oceanicznych, morskich i słodkowodnych. Formy planktonowe glonów odgrywają także duże znaczenie w procesie biologicznego samooczyszczania się wód. Przyczyniają się do oczyszczania wód z pierwiastków biogenych (N, P).

W literaturze można znaleźć informacje, że niektóre glony z gatunków *Ulva* (= ulwa, błonica, watka) mogą być dobrymi wskaźnikami podwyższonych koncentracji chlorków czy azotu w wodzie i skażenia wód metalami ciężkimi. Badania nad bioindykacyjną rolą tych glonów prowadzono dotychczas w estuariach i w pasie wód przybrzeżnych mórz i oceanów. Coraz częstsze masowe pojawy makroglonów *Ulva* w wodach śródlądowych zainicjowały tego typu badania z wykorzystaniem plech tej zielenicy. Celem przeprowadzonych badań było określenie stężenia wybranych pierwiastków (Cd, Pb, Ni, Mg, Ca)

w komórkach plech *Ulva* oraz w wodzie, w której te plechy intensywnie się rozwijały. Ponadto próbowano określić czy w komórkach *Ulva* dochodzi do kumulacji metali ciężkich i jeśli tak to jakich pierwiastków.

2. ZASTOSOWANIE GLONÓW W ENERGETYCE

Zastosowanie glonów w energetyce i przemyśle odnosi się głównie do oczyszczania spalin i produkcji biopaliw. Zielenice cechują się cenną własnością pochłaniania tlenków azotu i węgla z wydzielaniem czystego tlenu i azotu oraz przydatnych produktów ubocznych. Proces ten przebiega w ramach fotosyntezy stanowiącej podstawę metabolizmu roślin.

Z powodu dużej zależności intensywności metabolizmu glonów od nasłonecznienia, dotychczas projektowane układy oczyszczania spalin na bazie tych organizmów były z konieczności zbyt złożone i kosztowne dla większych aplikacji. W praktyce układy te przybrały kształt dużych, płytkich zbiorników wyposażonych w złożone instalacje pompowe i filtrujące lub też były zamkniętymi bioreaktorami o nie mniej skomplikowanej budowie i wysokich kosztach eksploatacji. W obu koncepcjach nie udało się rozwiązać w zadowalający sposób problemu optymalnego nasłonecznienia całej objętości glonów, a także ich dostarczania i usuwania do i z instalacji. Postępu na drodze do opanowania technologii oczyszczania spalin za pomocą glonów dokonały ostatnie badania. Technologia, która została opracowana umożliwia zamianę gazowych zanieczyszczeń na wysokokaloryczną biomasę o wielorakich zastosowaniach, m.in. jako biopaliwo, składnik pokarmów, surowiec dla przemysłu chemicznego farmaceutycznego, a także do wytwarzania wodoru. Jeden z perspektywicznych projektów, przewiduje budowę instalacji na bazie glonów w elektrowni węglowej o mocy 250 MW. Wytwarzałyby ona 75 tys. baryłek biooleju napędowego rocznie, jednocześnie usuwając 55 tys. ton dwutlenku węgla i 100 ton tlenków azotu. Pierwszym krokiem do tego celu stało się uruchomienie pilotowej instalacji w elektrociepłowni w Cambridge (Massachusetts). Według twórców układu wynalazek ten stanowi rozwiązanie przejściowe między poprzednimi systemami, a nowymi, ekonomicznie opłacalnymi koncepcjami dla energetyki. Dodatkową zaletą układu jest wspomniane wytwarzanie cennych pozostałości organicznych, które następnie można wykorzystać do produkcji tworzyw sztucznych i biooleju. Wysuszone pozostałości glonów można dodawać do węgla jako cenny składnik o charakterze paliwa odnawialnego [1].

3. CEL BADAŃ

Celem badań było oznaczanie metali, takich jak wapń, magnez, nikiel, ołów oraz kadm w słodkowodnych i morskich formach makroskopowych zielenic z rodzaju *Ulva* oraz w zbiornikach wodnych metodami fluorescencji rentgenowskiej **XRF** (ang. X-ray Fluorescence) oraz spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem plazmowym ICP-OES (ang. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy).

4. ZIELENICE (*CHLOROPHYTA*)

Zielenice w ujęciu taksonomicznym są gromadą glonów [2] należąca do cesarstwa Eucaryota (organizmy o komórkach posiadających jądro), królestwa Plantae (roślin). W obrębie zielenic spotkać można zarówno organizmy jednokomórkowe, jak również wielokomórkowe. Organizmy wielokomórkowe (którymi w głównej mierze są glony roślinopodobne) mają skomplikowany stopień organizacji, co przejawia się w ich zróżnicowanej budowie plechy. Plechy zielenic w zależności od gatunku mogą osiągać rozmiar od kilku mikronów do dziesiątek metrów, często przybierając kształt gdzie można wyróżnić część liściokształtną (fylloid), łodygokształtną (kauloid) i chwytники (ryzoid). Chwytники przytwierdzają ciało glonu do dna morskiego zbiorniku wodnym, by nie został on porwany przez prądy wody. Natomiast pozostałe części plechy glonów mają nie tylko podobny kształt, ale pełnią także podobne funkcje co liście i łodygi w naziemnych roślinach zielonych: fylloid pełni funkcję asymilacyjną, a kauloidem transportowane są składniki odżywcze.

Charakterystyczne dla zielenic jest występowanie barwników fotoaktywnych, podobnych do barwników roślin zielonych: chlorofile b i a, karoteny i ksantofil. Z tego powodu uważa się, że to właśnie zielenice są praprzodkami roślin zielonych. Materiałem zapasowym w komórkach zielenic jest skrobia, magazynowana w chloroplastach, w charakterystycznych tworach, zwanych ziarnami skrobiowymi. Ściana komórkowa zielenic jest zbudowana z celulozy lub hemicelulozy (obie substancje są polisacharydami). W rozwoju zielenic występują stadia zdolne do ruchu, wyposażone w dwie równe wici, dzięki którym mogą się przemieszczać w pożądanym kierunku [3, 4].

System oparty na budowie aparatu wiciowego, rodzaju kario- i cytokinezy oraz, na wynikach badań genetycznych dzieli gromadę zielenic na 11 klas ale tylko przedstawiciele 4 klas zielenic licznie występują w wodach śródlądowych Polski [5].

4.1. WYSTĘPOWANIE ZIELENIC MAKROSKOPOWYCH W WIELKOPOLSCE

Na terenie Wielkopolski najdokładniej poznaną grupą makroglonów są ramienice (*Characeae; Chlorophyta*). Większość z krajowych gatunków ramienic występuje w wodach słodkich, nieliczne z nich związane są z wodami lekko zasolonymi. Na obszarze śródlądowym Polski, poza wspomnianymi ramienicami, występuje inna grupa interesujących makroglonów, reprezentujących wyróżnialne makroskopowo zielenice z rodzaju *Ulva* (syn. *Enteromorpha* – taśma). Występują one w polskich jeziorach, stawach, strumieniach i rzekach [6]. Gatunki należące do rodzaju *Ulva* są kosmopolitycznymi makrozielenicami spotykanymi w większości mórz i oceanów Świata. Rodzaj ten nie jest jednak ściśle przywiązany do środowisk morskich. Jego przedstawiciele spotyka się także w wodach śródlądowych wielu krajów europejskich. Słodkowodne formy osiągają niejednokrotnie znaczną biomasę i stają się wyraźnym dominatem w warstwie powierzchniowej jezior, stawów oraz ekosystemów płynących, jak rzeki i drobne strumienie. Znajomość rozmieszczenia makroglonów z rodzaju *Ulva* na obszarze śródlądowym kraju jest istotna ze względu na funkcję bioindykacyjną tych gatunków, jaką pełnią w ekosystemach wodnych. Obecność plech *Ulva* w ekosystemach słodkowodnych może wskazywać także na skażenia wód metalami ciężkimi, jak i na obecność podwyższonych koncentracji chlorków [7].

Najpowszechniej spotykaną makrozielenicą w wodach słodkich Polski jest *U. intestinalis* L., z kolei najrzadszą jest *U. paradoxa* C. Agardh. Gatunki te są glonami epifitycznymi, porastającymi wszelkie dostępne, zanurzone w wodzie substraty, jak: skały, muszle mięczaków, falochrony, betonowe i metalowe konstrukcje, czy kładłuby statków. Centrum występowania form morskich tego rodzaju w Europie znajduje się w rejonach północno-zachodniego Bałtyku. Na terenie Polski występuje 13 taksonów z rodzaju *Ulva*, lecz jedynie 6 z nich notowano w ekosystemach słodkowodnych zlokalizowanych w głębi kraju. Gatunkami o szerokiej amplitudzie ekologicznej, zdolnymi do rozwoju w wodach o zróżnicowanym zasoleniu, jak i wodach słodkich są: *Ulva compressa* L., *U. flexuosa* Wulfen, *U. flexuosa* subsp. *pilifera* Blinding, *U. intestinalis* L., *U. paradoxa* C. Agardh oraz *U. prolifera* J. Agardh. Gatunkami z rodzaju *Ulva* związanymi wyłącznie z wodami przybrzeżnymi Bałtyku są z kolei *Enteromorpha clathrata* Greville, *Ulva lactuca* L., *Enteromorpha lingulata* Agardh, *Ulva linza* L. Gardh, *Ulva muscoides* Clemente, *Ulva procera* (K. Ahlner) Hayden i in., oraz *Ulva radiata* J. Agardh (Tabela 1).

Tabela 1. Gatunki z rodzaju *Ulva* sp. występujące w ekosystemach morskich i słodkowodnych Polski [7].

Lp.	Gatunek	Bałtyk	Ekosystemy słodkowodne Polski
1.	<i>Enteromorpha clathrata</i> Greville 1830	+	-
2.	<i>Ulva lactuca</i> L. 1753	+	-
3.	<i>Enteromorpha lingulata</i> Agardh 1883	+	-
4.	<i>Ulva linza</i> L. Gardh 1883 =(<i>Enteromorpha linza</i> J. Gardh 1883)	+	-
5.	<i>Ulva muscoides</i> Clemente 1807 =(<i>Enteromorpha ramulosa</i> Hooker 1883)	+	-
6.	<i>Ulva procera</i> (Ahlner) =(<i>Enteromorpha ahlneriana</i> Blinding 1963)	+	-
7.	<i>Ulva radiata</i> (J. Agardh) =(<i>Enteromorpha radiata</i> (J. Agardh) Lakowitz 1928)	+	-
8.	<i>Ulva flexuosa</i> Wulfen 1803 =(<i>Enteromorpha flexuosa</i>)	+	+
9.	<i>Ulva flexuosa</i> subsp. <i>pilifera</i> Blinding 1963 =(<i>Enteromorpha flexuosa</i> subsp. <i>pilifera</i> Blinding 1963)	+	+
10.	<i>Ulva paradoxa</i> C. Agardh 1817 =(<i>Enteromorpha flexuosa</i> subsp. <i>paradoxa</i> (C. Agardh) Blinding 1963)	+	+
11.	<i>Ulva compressa</i> L. 1753 =(<i>Enteromorpha compressa</i> (L.) Ness 1820)	+	+
12.	<i>Ulva intestinalis</i> L. 1753 =(<i>Enteromorpha intestinalis</i> (L.) Link 1820)	+	+
13.	<i>Ulva prolifera</i> J. Agardh 1883 =(<i>Enteromorpha prolifera</i> J. Agardh 1882)	+	+

5. METODYKA BADAŃ

5.1. METODY MINERALIZACJI PRÓBEK ROŚLINNYCH

Aby próbka została przebadana musi być przeprowadzona w postać płynną. Metodą przeprowadzania ciała stałego w ciecz jest mineralizacja. Podczas rozkładu (mineralizacji) próbek roślinnych najważniejszym problemem jest całkowite utlenienie części organicznej, przy możliwie najmniejszych stratach oraz najmniejszym zanieczyszczeniu materiału analizowanego. Ogólnie stosuje się dwie różne metody mineralizacji: na mokro lub na sucho. Obecnie w analityce

materiału roślinnego większą rolę odgrywają techniki rozkładu próbek na mokro, pod wpływem tlenu uwalnianego z kwasów w podwyższonej temperaturze.

5.1.1. MINERALIZACJA NA SUCHO MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Jest to najstarsza i najprostsza (bez użycia reagentów) metoda polegająca na zwęglaniu (spopieleniu) materiału roślinnego w piecu muflowym stosując zakres temperaturowy:

- 400-600 °C,
- 500-600 °C (2 h),
- 500-800 °C (30 min) oraz temp. 456 °C przez 2 h i 4 h lub 450 °C przez 4 h i 24 h.

Do pozostałości po mineralizacji dodawano: HCl, HCl+HNO₃+HClO₄, HCl+HNO₃+HF, HNO₃+HClO₄, HNO₃+H₂O₂ i ogrzewano na łaźni wodnej, aż do rozpuszczenia pozostałości mineralnej.

5.1.2. MINERALIZACJA NA MOKRO MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Rozkład na mokro może być prowadzony zarówno w układzie otwartym jak i zamkniętym. Rozkład w układzie zamkniętym jest szczególnie polecany w analizie śladowej. W ten sposób można uniknąć strat analitów oraz zapobiec wtórnym zanieczyszczeniom próbki, a także przeprowadzić rozkład w podwyższonej temperaturze i ciśnieniu, co ma niebagatelne znaczenie dla skrócenia czasu przebiegu procesu. Należy zaznaczyć, że temperatury stosowane w trakcie rozkładu na mokro są znacznie niższe niż przy rozkładzie na sucho. W związku z tym straty związane z odparowaniem lotnych składników są mniejsze. Jednak, w przypadku rozkładu na mokro dość często nie zachodzi całkowite rozpuszczenie próbki. W czasie rozkładu na mokro może wystąpić jeszcze jedno niepożądane zjawisko, a mianowicie współstrącenie analitów z osadem tworzącym się w mieszaninie utleniającej, używanej do rozkładu (np. współstrącenie PbSO₄ na osadzie CaSO₄ w trakcie rozkładu próbki) [8, 9].

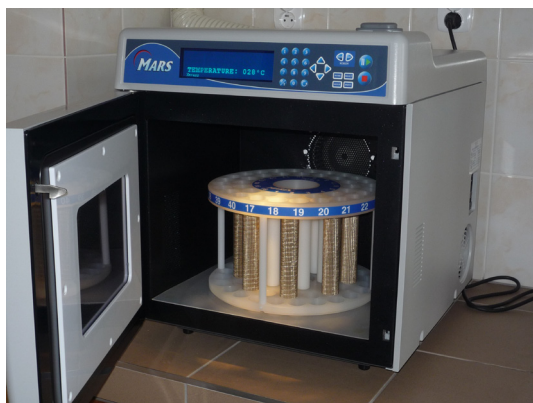
5.2. APARAT „MARSXPRESS”

Mikrofalowy system przygotowania próbek, model MARS przeznaczony jest do laboratoryjnego roztwarzania, rozpuszczania, hydrolizy, ekstrakcji lub suszenia szerokiego zakresu materiałów. Głównym jego zadaniem jest szybkie przygotowanie próbek do analizy za pomocą spektrometrii absorpcji atomowej (AA), spektrometrii emisyjnej (ICP) oraz chromatografii gazowej lub cieczowej.



Urządzenie MARS składa się z:

- generatora mikrofalowego o mocy wyjściowej regulowanej przez operatora w zakresie do 1600 W,
- pokrytej tworzywem fluoropolimerowym wnęki mikrofalowej,
- wentylatora wnęki oraz rury wentylacyjnej do odciążenia oparów,
- wbudowanego komputera pozwalającego na zaprogramowanie 100 programów, zawierających maksymalnie do 5 etapów,
- naprzemiennego lub ciągłego systemu talerza obrotowego,
- trzech układów zabezpieczeń drzwi oraz systemu blokady, zabezpieczającej przed emisją mikrofal, gdy drzwi urządzenia są otwarte.



Urządzenie MARS wykorzystuje energię mikrofalową do ogrzewania próbek. Związki takie jak woda oraz inne roztwory polarne szybko pochłaniają energię mikrofalową. Próbka umieszczona w naczyniu przepuszczającym mikrofałe z roztworem polarnym lub jonowym (zwykle roztworem kwasu) jest poddawana wewnątrz urządzenia MARS szybkiemu ogrzaniu pod zwiększonym ciśnieniem, co powoduje jej rozтворzenie lub rozpuszczenie w bardzo krótkim czasie.

6. METODY ANALITYCZNE STOSOWANE W PRACY

Do wykonania analizy jakościowej i ilościowej badanej substancji stosuje się różne techniki analityczne, do których należą metoda spektrometrii ICP-OES, oraz metoda, która pozwala łatwo i szybko oznaczyć skład jakościowy badanych substancji czyli spektrometria XRF.

6.1. SPEKTROMETRIA ICP



ICP-MS należy do grupy metod analitycznych umożliwiających szybką analizę wielopierwiastkową w różnego typu materiałach biologicznych i środowiskowych. Metoda ta wymaga przeprowadzenie próbek stałych do postaci ciekłej za pomocą mineralizacji kwasem azotowym V w piecu mikrofalowym

„MarsXpress”. Technika ta jest bardzo czuła, selektywna, i charakteryzuje się wysoką precyzją, i niska granicą wykrywalności w zakresie ppm i ppb.

Spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) jest techniką, w której wykorzystuje się pomiar intensywności strumienia powstałego w plazmie jonów. Wytworzone jony w plazmie sprzężonej indukcyjnie są następnie rozdzielane za pomocą analizatora mas ze względu na ich wartość stosunku masy do ładunku. Do zalet ICP-MS należą bardzo niskie granice wykrywalności wielu pierwiastków na poziomie pg/L uzyskiwane dzięki blisko 100 % wydajności jonizacji w plazmie ICP, duża selektywność i doskonała czułość, które umożliwiają oznaczenie całego spektrum pierwiastków w tym samym czasie, a także określenie stężeń poszczególnych izotopów danego pierwiastka w złożonych matrycach [8].

Próbki są analizowane w postaci ciekłej za pomocą systemu wprowadzającego, składającego się z rozpylacza i komory mgielnej.

I. Charakterystyka widma atomów (jonów)

Każdy pierwiastek przeprowadzony w stan lotny, a następnie wzbudzony (przejście do wyższego stanu energetycznego) w odpowiednim źródle plazmy, emituje promieniowanie elektromagnetyczne, które zawiera jedynie pewne, charakterystyczne dla danego pierwiastka długości fal: $\lambda_1, \lambda_2 \dots$. Promieniowanie to można rozszczepić za pomocą przyrządów spektralnych i zarejestrować jako widmo liniowe danego pierwiastka, czyli zbiór linii spektralnych o określonych długościach fal, charakterystycznych dla danego pierwiastka i jego stanu energetycznego. To, że widmo atomów i jonów jest liniowe wynika z faktu, że ich energia wewnętrzna jest kwantowana. Światło emitowane przez wzbudzone atomy przypada na obszar widzialny widma (380 - 780 nm), bliską podczerwień (w zakresie 780 – 1500 nm) oraz próżniowy i bliski ultrafiolet (w zakresie 100 – 380 nm).

Widmo liniowe danego pierwiastka, będące funkcją struktury i obsadzenia powłok elektronowych jego atomów, pozwala na jednoznaczne odróżnienie go od pozostałych i dlatego stanowi podstawę jakościowej analizy spektralnej, natomiast ilościowa analiza spektralna opiera się na zależności jaka istnieje między natężeniem linii emisyjnej a zawartością danego pierwiastka w badanej próbce.

Atomowa spektrometria emisyjna pozwala na jednoczesne wykrycie lub oznaczenie wielu pierwiastków przy znikomych nawet zawartościach każdego z nich. Metody analizy spektralnej znajdują zastosowanie w przemyśle chemicznym, metalurgicznym, farmaceutycznym, w badaniach geologicznych i astrofizycznych; w medycynie, biologii, archeologii, ochronie środowiska

kryminalistyce i wielu innych dziedzinach nauki i techniki.

Plazma indukcyjnie sprzężona (ICP – inductively coupled plasma) jest to wysokotemperaturowe wyładowanie generowane przez przewodzący gaz przepływający przez pole magnetyczne o częstości radiowej (najczęściej 27 MHz lub 40 MHz), wzbudzone cewką indukcyjną otaczającą korpus palnika. Niemal wyłącznie stosuje się plazmę argonową; składa się ona z atomów i jonów argonu oraz elektronów. Podczas gdy argon przepływa przez palnik, wytwarza się krótkotrwałe wyładowanie w wyniku czego z atomów argonu wybijane są elektrony. Pole magnetyczne wychwytuje je i przyspiesza. Dzięki wysokiej energii elektrony, zderzając się z atomami argonu powodują, w wyniku reakcji łańcuchowej, wytworzenie dalszych elektronów, a w konsekwencji przekształcenie gazu w stan plazmy. Dostarczenie elektronom energii przez cewkę nazywa się wzbudzeniem indukcyjnym. Plazma indukcyjnie wzbudzona jest widoczna jako intensywne, świecące wyładowanie o charakterystycznym kształcie stożka. Temperatura plazmy jest bardzo wysoka i wynosi od 6000 do 10 000 K. Wysoka temperatura wpływa na zwiększenie efektywności procesów wzbudzenia i jonizacji oraz zmniejsza możliwość występowania interferencji chemicznych. Analizowana próbka, najczęściej w formie roztworu, jest zasysana przez układ nebulizera za pomocą pompy perystaltycznej i wprowadzana w postaci aerozolu do palnika. Tam zachodzą kolejno procesy desolvatacji, parowania, atomizacji, wzbudzenia i jonizacji [9, 10].

Wzbudzone cząstki emitują promieniowanie elektromagnetyczne, charakterystyczne dla danego pierwiastka. Promieniowanie jest rozszczepiane w monochromatorze, a następnie rejestrowane przez fotopowielacz, gdzie sygnał optyczny jest zamieniany na sygnał elektryczny, a ten z kolei przetwarzany na sygnał cyfrowy, który jest przekazywany do pamięci komputera. Kontrola i sterowanie pracą przyrządu oraz obróbka danych odbywa się komputerowo, przy zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania.

Metodą emisyjnej atomowej spektrometrii indukcyjnie sprzężonej plazmy (ICP-AES inductively coupled plasma atomic emission spectrometry) można oznaczać ok. 70 pierwiastków. Wśród pierwiastków, dla których ta metoda nie jest przydatna znajdują się m.in. niektóre fluorowce i gazy szlachetne, ponieważ ich atomy mają wysokie energie wzbudzenia, nieosiągalne w plazmie argonowej. Granice wykrywalności w ICP-AES są bardzo niskie, rzędu ppb ($\mu\text{g/l}$); dla 33 pierwiastków nie przekraczają $5 \mu\text{g/l}$, a dla berylowców są nawet rzędu $0,1 \mu\text{g/l}$.

Metoda ICP-AES cechuje się dobrą precyzją oraz szerokim zakresem prostoliniowości krzywej wzorcowej, rozciągającym się do stężeń 10⁴ - 10⁶ razy większych od granicy wykrywalności, np. dla manganu górna granica stężenia dla mierzonej linii o $\lambda=257,61 \text{ nm}$ wynosi $0,05\text{g/l}$ (ok. 50ppm) a dolna

0,4 ppb. Dzięki temu metoda ta daje możliwość dokładnego oznaczania danego pierwiastka w zakresie od ilości śladowych po makroskładniki bez konieczności wielokrotnego rozcieńczenia próbki.

Zasadnicze elementy spektrometru ICP:

- rozpylacz próbek,
- palnik plazmowy,
- układ grzania indukcyjnego,
- układ sprzęgający,
- analizator mas,
- detektor jonów,
- układ pomp [9, 10].

6.1.1. METODA ICP W ANALIZIE PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

Zastosowanie spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie ICP należy do grupy metod analitycznych umożliwiających szybką analizę wielopierwiastkową. Spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie wykorzystuje zjawisko plazmy. Plazmę definiuje się jako silnie zjonizowany gaz, w którym liczba wolnych elektronów jest równa liczbie jonów dodatnich. Plazma sprzężona indukcyjnie jest specjalnym rodzajem plazmy, generowanej w znajdującym się pod ciśnieniem atmosferycznym gazie (zwykle argonie), który przepływa przez cewki indukcyjne wytwarzające wysokoenergetyczne pole magnetyczne o wysokiej częstotliwości. Cewki te zwykle pracują z częstotliwością około 30 MHz i na poziomach energii 1000-2000 W. Temperatura, jaką uzyskujemy w tak wytworzonej plazmie, zawiera się w przedziale 6000- -10 000 K, co jest wystarczające, aby wzbudzić lub zjonizować większość badanych analitów. Kwarcowy palnik, w którym tworzy się plazma, składa się z trzech koncentrycznych rurek, przy czym w każdej z nich argon przepływa z innym natężeniem. Otrzymane w ten sposób trzy strumienie argonu tworzą trzy główne składniki plazmy: zewnętrznym kanałem płynie gaz chłodzący oraz pomocniczy, kanałem środkowym – gaz, który zapobiega rozproszeniu lub załamaniu się stożka plazmowego, natomiast centralnym kanałem wprowadzana jest próbka w postaci aerozolu lub gazu. Jony pochodzące z ICP są następnie zasysane do wnętrza spektrometru masowego, przechodząc przez dwa stożki (przeważnie niklowe, ale mogą być również wykonane z platyny). Następnie jony są ogniskowane za pomocą soczewek jonowych i przepływają dalej do właściwego detektora masowego, którym z reguły jest kwadrupol. Analizator ten zbudowany jest z czterech symetrycznie ułożonych równoległych prętów, najlepiej o przekroju hiperbolicznym. Przeciwniegle pręty

są ze sobą połączone elektrycznie, do dwóch sąsiednich prętów kwadrupola przyłożone jest napięcie, które jest sumą napięcia stałego i zmiennego. W tak utworzonym polu elektromagnetycznym tylko jony o odpowiednim stosunku ładunku do masy poruszają się w centralnej jego części; pozostałe ulegają rozproszeniu i nie przechodzą przez analizator. Poprzez zmianę napięcia stałego lub zmiennego, a także częstotliwości napięcia przyłączonego do prętów można ustawić analizator w taki sposób, aby przepuszczał tylko jony o określonym zakresie stosunku masy do ładunku (m/z) i z określoną dokładnością. Dzięki niskim kosztom produkcji, prostemu działaniu oraz relatywnie szybkiemu rozdzielaniu jonów ze względu na ich stosunek masy do sygnału są one najczęściej stosowanym analizatorem w technice ICP-MS. Tak rozdzielone jony są następnie zliczane w powielaczu elektronowym. Zasadniczymi elementami spektrometru ICP-MS są: układ wprowadzania próbek (nebulizer, komora mgielna), palnik plazmowy, stożki, układ soczewek jonowych, analizator mas (kwadrupol), detektor jonów oraz układ pomp wytwarzających próżnię. Aby osiągnąć lepszą rozdzielczość i przez to zredukować powstające interferencje izobaryczne, można zastosować analizator masowy z podwójnym ogniskowaniem lub dynamiczną komorą reakcyjną. Dynamiczna komora reakcyjna jest to dodatkowy kwadrupol umieszczony w przestrzeni pomiędzy systemem soczewek jonowych a kwadrupolem analizującym. Przestrzeń ta wypełniona jest przez reaktywny gaz, np. CH_4 czy NH_3 . Gaz ten reaguje z wiązką jonów, zmieniając interferenty w formy, które już nie przeszkadzają w oznaczaniu wybranych analitów. Interesujące nas anality są natomiast w warunkach panujących w komorze stabilne i w niezmiennym stanie dostają się do analizatora masowego. Konwencjonalne systemy ICP-MS są bardzo podatne na interferencje pochodzące od tworzących się wieloatomowych połączeń składników matrycy w plazmie.

6.1.2. ZASTOSOWANIE ICP W ANALIZIE PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

Większość analizowanych obecnie typów próbek środowiskowych, takich jak: woda pitna, wody gruntowe, ścieki, wody rzeczne oraz morskie, odpady stałe, gleby, osady ściekowe, osady rzeczne, a także pył zawieszony, wykorzystywana jest do śladowej analizy pierwiastków. Bez wątpienia wzrost zainteresowania tą techniką w analizach środowiskowych podyktowany jest ciągłym zastrzeżeniem się przepisów dotyczących zawartości maksymalnej analitów w próbkach.

Niejednokrotnie stężenia pierwiastków (w tym głównie metali ciężkich) w próbkach środowiskowych są tak niskie, że wykraczają poza możliwości detekcji innych technik analitycznych, takich jak: AAS, ICP-OES, XRF itd. Rozwój

spektroskopii atomowej, w szczególności ICP-MS, doprowadził naukowców do lepszego zrozumienia kwestii zanieczyszczenia środowiska i wpływu metali śladowych na ludzi.

Warto zwrócić uwagę na kwestię efektów toksyczności ołowiu, zwłaszcza u małych dzieci. Ołów może uszkadzać ośrodkowy układ nerwowy, nerki, układ rozrodczy, a na wyższych poziomach powodować nawet śpiączkę, drgawki czy śmierć. Nie jest znane żadne biologiczne czy fizjologiczne zastosowanie tego pierwiastka w organizmie ludzkim, którego właściwości powodują, że jest „chciwie” absorbowany przez organizm (najczęściej przez skórę lub doustnie). Ołów jest absorbowany w łatwiejszy sposób, gdy w organizmie występują niedobory wapnia i żelaza. Około 90% tego metalu ciężkiego jest kumulowane w kościach. Stężenie ołowiu we krwi można łatwo oznaczyć, stosując technikę ICP-MS. Według dzisiejszych standardów uważa się za podwyższone stężenie ołowiu u dzieci powyżej 100 ppb, a u dorosłych – powyżej 400 ppb, podczas gdy w latach siedemdziesiątych XX w. poziom toksyczności w wypadku dzieci wynosił 300 ppb (1978).

W analizach śladowych z wykorzystaniem materiału roślinnego zawsze spotykamy się z problemem wyboru reprezentatywnej próbki. Właściwe wykonanie działań na tym etapie analizy w dużym stopniu gwarantuje uzyskanie wiarygodnych wyników. Dlatego też, przy doborze próbek materiału roślinnego, należy zwrócić uwagę na ujednoczenie próbek pod względem gatunkowym, na zebranie odpowiedniej ilości materiału, porę i czas poboru, wykorzystanie tych samych części anatomicznych rośliny w toku całej analizy i wreszcie na zanieczyszczenie próbki.

W analityce śladów mogą być zastosowane tylko takie techniki rozkładu, które spełniają następujące wymagania:

- proces rozkładu próbki przebiega ilościowo, składniki organiczne powinny ulec całkowitej mineralizacji, a nieorganiczne przejść w formy rozpuszczalne,
- operacja rozkładu charakteryzuje się dużą szybkością i niewielkimi kosztami,
- powinna istnieć możliwość automatyzacji procesu,
- nowa matryca, która powstała po procesie rozkładu, nie może stanowić przeszkody w przeprowadzeniu oznaczenia z wykorzystaniem wybranej metody lub techniki analitycznej.

Oczywiście wszystkie czynności związane z procesem rozkładu muszą być przeprowadzone z zachowaniem wymogów obowiązujących w analizie śladowej. Zastosowanie właściwych technik przygotowania próbek ma, bowiem pierwszorzędne znaczenie i w sposób znaczący wpływa na jakość wyników

apalicznych, które są źródłem informacji o badanym obiekcie materialnym. Jeśli na tym etapie zostaną popełnione błędy, to mogą one doprowadzić do takiego zniekształcenia wyników oznaczeń końcowych, że zamiast być źródłem informacji będą one przyczyną dezinformacji. Należy podkreślić, że nie wszystkie techniki analityczne wykorzystywane w pierwiastkowej analizie śladów wymagają takiego samego stopnia rozkładu próbki.

Ze względu na ten czynnik, znane techniki analityczne można podzielić na trzy grupy:

- techniki nie wymagające uprzedniego rozkładu próbki (np. neutronowa analiza aktywacyjna NAA),
- techniki wymagające przynajmniej częściowego rozkładu próbki. Dokładność wyników, uzyskiwanych w przypadku zastosowania takich technik, nie pozostaje w ścisłym związku ze stopniem rozkładu próbki. Istnieje jednak zawsze ryzyko wystąpienia efektów matrycowych związanych z materią organiczną pozostałą w próbce. Jako przykłady tej grupy technik można wymienić elektrochemiczną spektrometrię absorpcji atomowej (FAGAS), płomieniową spektrometrię absorpcji atomowej (FAAS), spektrometrię emisji atomowej ze wzbudzeniem w indukowanej plazmie (ICP-AES),
- techniki wymagające całkowitej mineralizacji próbki. Należą do nich np. techniki elektrochemiczne – anodowa i katodowa woltamperometria inwersyjna (ASV) oraz potencjometria z zastosowaniem elektrod jonoselektywnych, czy spektroskopowe.

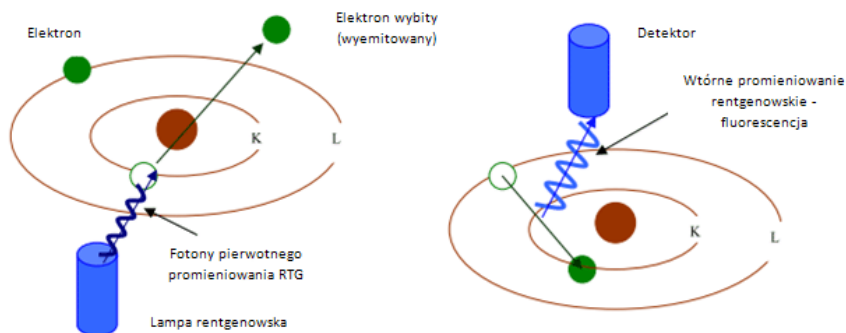
Droga prowadząca od pobrania próbki do uzyskania wyniku jest długa i obejmuje kilka etapów: pobieranie próbki i jej zabezpieczenie, dostarczenie do laboratorium, przygotowanie mechaniczne, przygotowanie chemiczne, analizę instrumentalną (pomiar) oraz opracowanie wyników pomiaru .

6.2. SPEKTROMETRIA XRF

Spektrometria XRF jest techniką służącą do identyfikacji pierwiastków w danej substancji i określenia ich ilości. Proces analizy jest bardzo szybki i pozwala ostatecznie określić skład pierwiastkowy próbki. Pierwiastki są wykrywane na podstawie charakterystycznej długości fali(X) lub energii (E) emisji promieniowania rentgenowskiego. Analizator wytwarza wiązkę promieniowania, która uderza w próbkę. Atomy próbki pochłaniają promieniowanie X , a następnie emitują promieniowanie o długości fali charakterystycznej dla poszczególnych pierwiastków obecnych w próbce. Pierwiastki fluoryzują na różnych poziomach energetycznych, których wartość jest mierzona przez analizator.

Zaletami spektrometrii XRF jest to, iż badanie nie jest inwazyjne, nie niszczy próbek oraz wymaga niewielkiego przygotowania próbki [11,12].

Każdy atom posiada ustaloną liczbę elektronów (cząstek naładowanych ujemnie) rozmieszczonych na orbitalach wokół jądra. Liczba elektronów w danym atomie jest równa liczbie protonów (cząstek naładowanych dodatnio) w jądrze a liczba protonów jest równa liczbie atomowej podanej w układzie okresowym pierwiastków. Do każdej liczby atomowej przypisana jest nazwa pierwiastka, np. żelazo (Fe) z liczbą atomową 26. Spektroskopia z wykorzystaniem energii rozproszonej (ED) XRF oraz spektroskopia z wykorzystaniem rozproszonej długości fali (WD) XRF wykorzystują oddziaływania na orbitalu K, L oraz M, gdzie K jest poziomem energetycznym najbliższym jądra. Każdy orbital elektronowy odpowiada określonemu i różnemu dla każdego pierwiastka poziomowi energii.



Rys. 1. Proces fluorescencji.

6.3. SPEKTROMETRIA FLUORESCENCJI RENTGENOWSKIEJ

Cechy metody pomiarowej:

- analizy dotyczą próbek stałych i ciekłych (po odparowaniu rozpuszczalnika), nieorganicznych i organicznych, biologicznych oraz całych przedmiotów,
- zakres analizowanych pierwiastków: od krzemu do najcięższych (łącznie z lantanowcami i aktynowcami),
- równoczesny pomiar zawartości wielu mierzalnych pierwiastków wchodzących w skład próbki,
- czułość metody XRF wzrasta ze wzrostem liczby atomowej pierwiastków. W pierwszym zakresie od krzemu do rutenu, w drugim

od rodu do najcięższych, trzeci zakres przeznaczony jest głównie do analizy lantanowców. Niezależnie od tego czułość jest proporcjonalna do pierwiastka kwadratowego z czasu pomiaru. Po czasie pomiaru przekraczającym 1 godz. analiza zwykle uzyskuje rangę mikrośladowej. Wyższe czułości odpowiadają zawartości pierwiastków rzędu 10^{-4} % (wagowo), po zabiegach mineralizacji - rzędu 10^{-5} - 10^{-6} %, a po odparowaniu rozcieńczalnika (np. próbka wody) nawet do 10^{-7} % w odniesieniu do pierwotnej masy próbki. Wymagana masa próbek użytych do pomiaru podyktowana jest czułością spektrometru dla określonych pierwiastków: minimum dziesiąte części miligrama, standardowo 0,5 g lub całe przedmioty,

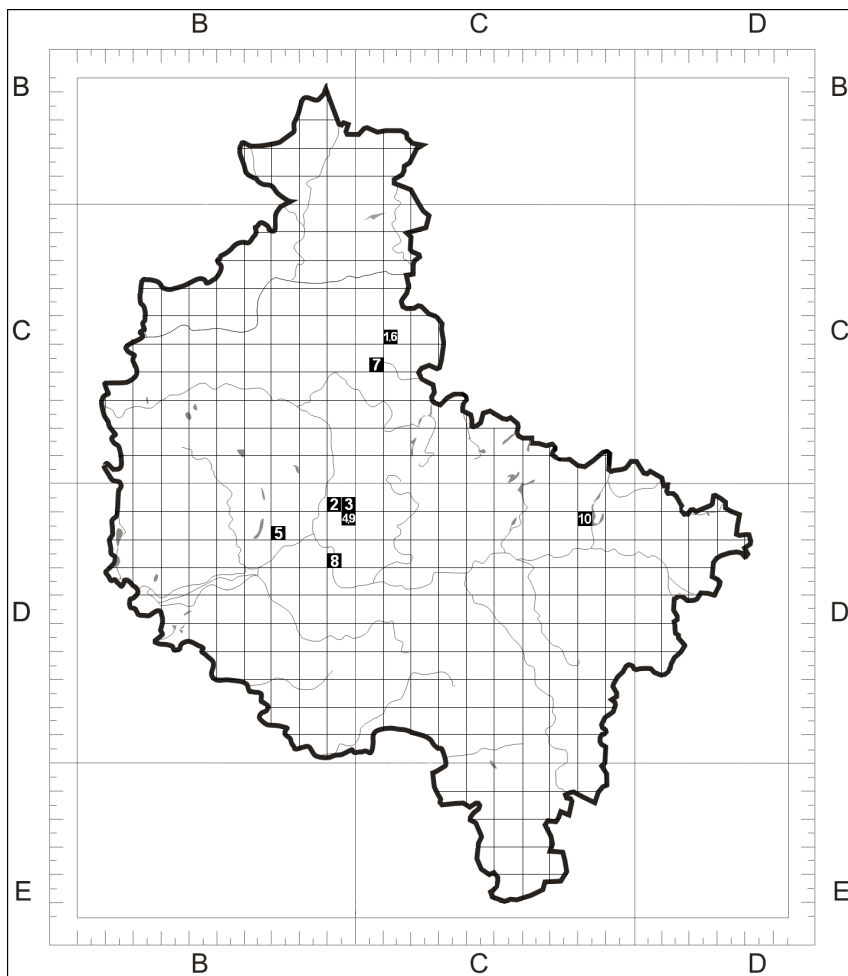
- możliwość odzyskania próbek w stanie nie zmienionym,
- niezależność wyników pomiarów od wiązań chemicznych dzięki wzbudzeniu najgłębszych poziomów energetycznych w atomach,
- ograniczona mało kosztowna preparatyka chemiczna (jeśli jest konieczna); standardowo próbki poddaje się mechanicznej homogenizacji z dodatkiem standardów wewnętrznych,
- małe prawdopodobieństwo wtrącenia zanieczyszczeń w związku z ograniczoną preparatyką chemiczną oraz dzięki niewrażliwości detektora na zanieczyszczenie układu wzbudzania i detekcji.

7. AKTUALNY STAN ROZPOZNANIA ROZMIESZCZENIA STANOWISK GATUNKÓW Z RODZAJU *ULVA* W WIELKOPOLSCE

Spośród sześciu gatunków z rodzaju *Ulva* notowanych w ekosystemach słodkowodnych Polski, trzy występują na terenie Wielkopolski. Gatunki takie jak: *Ulva compressa* L., *U. intestinalis* L. czy *U. prolifera* J. Agardh zaobserwowano od początku lat 60-tych do 2008 roku łącznie na 10 stanowiskach. Stanowiska ulwy w Wielkopolsce koncentrowały się w centralnej jej części, pojedyncze stanowiska występowały na wschodzie i północy regionu (Rys. 2). W większości przypadków stanowiska tych zielenic znajdowały się w bliskim sąsiedztwie aglomeracji miejskich (miasto Poznań, Konin czy Wągrowiec), jak i szlaków komunikacyjnych (autostrada A2 Nowy Tomyśl – Stryków).

W czasie prowadzonych po 2008 roku badań hydrobiologicznych na ekosystemach słodkowodnych zlokalizowanych na obszarze Wielkopolski jak i innych województw, odnaleziono kolejne stanowiska *Ulva*. Do czerwca 2010 roku odnaleziono kolejnych 5 stanowisk błonic na terenie Wielkopolski, zlokalizowanych w dolinie rzeki Cybina, Warta oraz Noteć. Obserwowano również stabilne populacje *Ulva* sp. łącznie na trzech stanowiskach; w

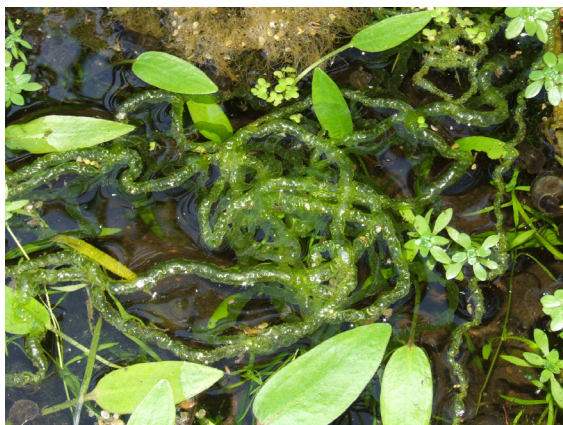
województwie łódzkim, zachodniopomorskim oraz warmińsko-mazurskim.



Rys. 2. Rozmieszczenie stanowisk gatunków z rodzaju *Ulva* sp. w Wielkopolsce na mapie z siatką kwadratów ATPOL. Stanowiska *U. compressa*: 1- J. Laskownickie okolice Gołańczy, 2- strumień Świątnica w Poznaniu, 3- strumień Dworski Rów w Poznaniu, 4- strumień Michałówka w Poznaniu; stanowiska *U. intestinalis*: 5- rzeka Samica Stęszewska, okolice Stęszewa, 6- J. Laskownickie, 7- rzeka Nielba w Wągrowcu, 8- starorzecze Warty; stanowiska *U. prolifera*: 9- staw Tulecki na rzece Kopla, okolice Poznania, 10- J. Wąsowsko-Mikorzyńskie, okolice Konina.

8. MATERIAŁ BADAŃ

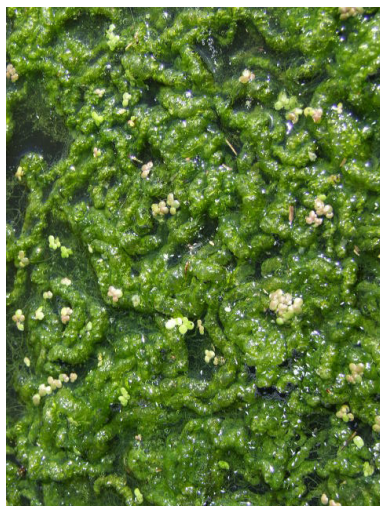
Materiał do badań stanowiły plechy słodkowodnych oraz morskich form gatunków z rodzaju *Ulva* sp, w których analizowano skład ilościowy i jakościowy metali ciężkich. Zawartość metali badano również w wodzie, z której rozwijały się populacje ulwy. Pobrano szereg prób plech i wody w zmiennym interwale czasowym z stanowisk zlokalizowanych na terytorium Polski, jak i za granicą (Dania). Z terenu Wielkopolski pobrano plechy ulwy występujące w: Zbiorniku Maltańskim w Poznaniu, glinianki we wsi Śródka pod Poznaniem, trzech „zbiorników ekologicznych” przy trasie autostrady A2 (Nowy Tomyśl – Stryków) ulokowanych na wysokości miejscowości Bugaj i Markowice, strumienia Dworski Rów w Poznaniu (Rys. 3), strumienia Świątnica w Poznaniu, stawu Tuleckiego we wsi Tulce pod Poznaniem, jeziora Laskownickiego w okolicach Wągrowca. Próbkę plech morskich pobrano z litoralu Morza Bałtyckiego w okolicy Kołobrzegu i Gdyni oraz wyspy Bornholm (Dania).



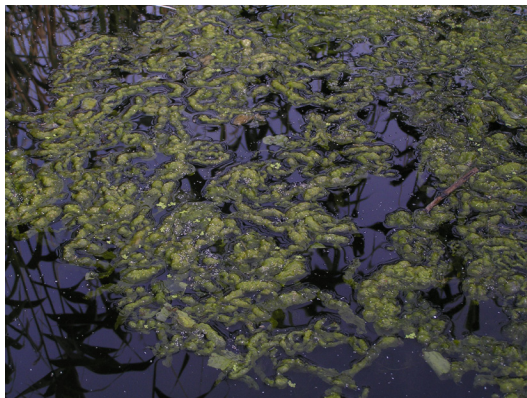
Rys. 3 Taśmo kształtne plechy *Ulva* sp. w strumieniu Dworski Rów, w otoczeniu *Alisma plantago-aquatica* oraz *Callitriche* sp. (fot. A. Rybak; czerwiec 2006).



Rys. 4. Wolno unoszące się po powierzchni wody plechy *Ulva prolifera* w stawie Tulckim z współwystępującymi lemnidami (fot. A. Rybak, czerwiec 2008).



Rys. 5. Plechy *U. compressa* w strumieniu Świętnica z *Lemna minor* (fot. A. Rybak, lipiec 2007).

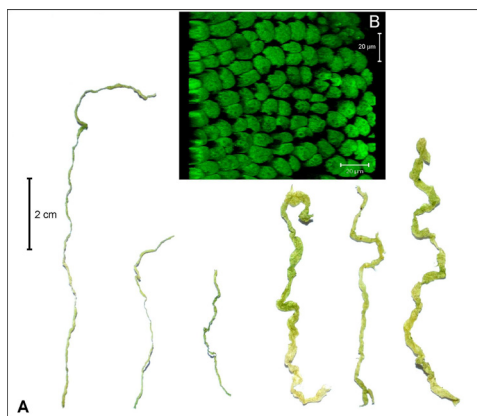


Rys. 7. Wolno unoszące się po powierzchni wody plechy *U. intestinalis* w J. Laskownickim (fot. B. Messyasz, czerwiec 2006)

Plechy z terenu pobierano w okresie letnim w latach 2006 – 2009. Zebrane plechy umieszczano w plastikowych pojemnikach i konserwowano formaliną o stężeniu 4 %. Część próby (± 10 g) do oznaczenia metali, zamrożono i przechowywano w temperaturze -10° C. Z każdego terminu poboru prób wykonano szereg preparatów mikroskopowych z różnych partii plechy. Na podstawie obserwacji tak przygotowanych preparatów dokonano identyfikacji gatunkowej [6, 13].



Rys. 8. Forma morska *U. intestinalis* z okolic Kołobrzegu (fot. A. Rybak, sierpień 2009).



Rys. 9. Słodkowodna forma *U. prolifera* ze stawu w Tulcach (fot. A. Rybak, sierpień 2008).



Rys. 10. Słodkowodna forma *U. cf. flexuosa* z Zbiornika Maltańskiego (fot. A. Rybak, czerwiec 2009).

9. ANALIZA ZAWARTOŚCI WYBRANYCH PIERWIĄSTKÓW PLECHACH *ULVA* POBRANYCH ZE ZBIORNIKÓW WODNYCH W WOJEWÓDZTWIE WIELKOPOLSKIM.

Pobrane próbki plech ulwy zostały poddane dokładnej analizie jakościowej i ilościowej pod względem zawartości badanych pierwiastków. Skład jakościowy wszystkich prób określono za pomocą spektrometrii XRF. Natomiast analizę

ilościową wszystkich prób wykonano przy użyciu spektrometrii ICP-OES (Varian ICP-OES VISTA-MPX).

9.1. MINERALIZACJA

Odczynniki

- Kwas azotowy (V) o stężeniu 65 % ($Hg < 0,0000005\%$)
- 30 % H_2O_2 cz.d.a.

Proces mineralizacji zielenic

Próbki plech zielenic dokładnie zważono i za pomocą plastikowej łyżeczki przeniesiono do teflonowych bomb. Następnie do każdej z prób dodano 15 ml stężonego kwasu azotowego (V) i 5 ml 30 % H_2O_2 . Tak przygotowane próby poddano dwustopniowej ciśnieniowej mineralizacji mikrofalowej w układzie zamkniętym. Przeprowadzono ją w piecu „MarsXpress” przy następujących parametrach:

Parametry	I stopień	II stopień
Moc [%]	100	100
Temperatura [°C]	450	800
Czas [s]	480	420

Po przeprowadzonej mineralizacji próbki przeniesiono do plastikowych pojemników, a następnie poddano analizie spektroskopią ICP-OES.

9.2. ANALIZA ILOŚCIOWA BADANYCH PIERWIĄTKÓW W ZIELENICACH

Analiza ilościowa zawartości badanych pierwiastków w plechach błonic została przeprowadzona za pomocą spektrometrii ICP-OES. Ilościowe oznaczenie zawartości pierwiastków w badanych próbkach wykonano przy użyciu spektrometru mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej ICP-OES.

9.2.1. WYNIKI BADAŃ ICP

Próbki plech błonic zostały przeprowadzone do roztworu poprzez mineralizację, a następnie poddane analizie jakościowej przy użyciu spektrometru emisyjnego ICP-OES. W metodzie tej elektrony atomach zostają

wzbudzone do wyższych poziomów energetycznych, a następnie wracając do stanu podstawowego emitują promieniowanie o charakterystycznej długości fali dla danego pierwiastka (widmo emisyjne).

Pierwiastek	Długość fali λ [nm]
Wapń	422,673
Magnez	280,270
Nikiel	231,604
Ołów	216,999
Kadm	228,800

Otrzymane wyniki za pomocą spektrometrii ICP-OES potwierdziły występowanie badanych pierwiastków w próbkach plech badanych makrozielenic.

9.2.2. WYNIKI ILOŚCIOWEJ ANALIZY BADANYCH PIERWIASTKÓW W PLECHACH *ULVA*

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w plechach błonic pochodzących z „zbiorników ekologicznych” odbierających wody deszczowe z trasy autostrady A2 (Nowy Tomyśl – Stryków) przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Zawartość badanych pierwiastków w plechach błonic z okolic autostrady A-2.

Nazwa stanowiska	Lokalizacja stanowiska	wapń ppm [mg/kg]	magnez ppm [mg/kg]	nikiel ppm [mg/kg]	ołów ppm [mg/kg]	kadm ppm [mg/kg]
„zbiornik ekologiczny” kod: A2-6	Polska, Wielkopolska, okolice wsi Bugaj	182876,85	2598,96	118,95	1,50	5,00
„zbiornik ekologiczny” kod: A2-7	Polska, Wielkopolska, okolice Markowic	247114,43	4228,86	113,93	8,96	44,78
„zbiornik ekologiczny” kod: A2-14	Polska, Wielkopolska, Września	215169,66	3692,61	114,77	8,48	4,99

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w plechach błonic z rejonów nadmorskich przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Zawartość badanych pierwiastków w zielenicach z okolic nadmorskich

Nazwa stanowiska	Lokalizacja stanowiska	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	olów ppm	kadm ppm
Morze Bałtyckie (Kołobrzeg)	Polska, zachodnio-pomorskie, Kołobrzeg	7350,51	15113,97	230,43	2,48	41,30
Morze Bałtyckie (Gdynia)	Polska, pomorskie, Gdynia	25240,68	8146,14	174,03	2,47	24,69
Morze Bałtyckie (Bornholm)	Dania, Bornholm, Olene	135765,55	9519,54	122,11	3,49	34,89

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w plechach błonic z okolic Poznania przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Zawartość badanych pierwiastków w plechach błonic z okolic Poznania

Nazwa stanowiska	Lokalizacja stanowiska	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	olów ppm	kadm ppm
zbiornik Maltański	Polska, Wielkopolska, Poznań	193391,56	6509,56	207,65	2,47	16,48
glinianka „Śródka”	Polska, wielkopolskie, Śródka	29996,84	5841,49	225,77	2,37	126,30
strumień Dworski Rów	Polska, wielkopolskie, Poznań	161414,57	4451,78	121,55	9,00	15,01
strumień Świętnica	Polska, wielkopolskie, Poznań	50399,20	14271,46	130,74	13,47	179,64
staw Tulecki	Polska, wielkopolskie, Tulce	237781,77	5535,61	110,71	6,48	0,00
Jezioro Laskownicze	Polska, wielkopolskie, Wągrowiec	241874,38	3339,98	112,66	7,48	14,96

10. ANALIZA ZAWARTOŚCI WYBRANYCH PIERWIASTKÓW W WODACH, Z KTÓRYCH POBRANO PLECHY BŁONIC Z TERENU WOJEWÓDZTWA WIELKOPOLSKIEGO.

Pobrane próbki wody zostały poddane dokładnej analizie ilościowej pod względem zawartości badanych pierwiastków. Analizę ilościową wszystkich

prób wykonano przy użyciu spektrometrii ICP–OES (Aparat: Varian ICP-OES VISTA-MPX).

10.1. MINERALIZACJA

Odczynniki

- Kwas azotowy (V) o stężeniu 65 % (Hg<0,0000005%),
- 30 % H₂O₂ cz.d.a.

Proces mineralizacji wody

Próbki wody dokładnie odmierzone i przeniesiono do teflonowych bomb. Następnie do każdej z prób dodano 15 ml stężonego kwasu azotowego (V) i 5 ml 30 % H₂O₂. Tak przygotowane próby poddano dwustopniowej ciśnieniowej mineralizacji mikrofalowej w układzie zamkniętym. Przeprowadzono ją w piecu „MarsXpress” przy odpowiednich parametrach:

Parametry	I stopień	II stopień
Moc [%]	100	100
Temperatura [°C]	450	600
Czas [s]	600	300

Po przeprowadzonej mineralizacji próbki przeniesiono do plastikowych pojemników, a następnie poddano analizie spektroskopii ICP-OES.

10.2. ANALIZA ILOŚCIOWA BADANYCH PIERWIASTKÓW W WODZIE

Analiza ilościowa zawartości badanych pierwiastków w wodzie została przeprowadzona za pomocą spektrometrii ICP-OES. Ilościowe oznaczenie zawartości pierwiastków w badanych próbkach wykonano przy użyciu spektrometru mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej ICP-OES (Aparat: Varian ICP-OES VISTA-MPX).

10.2.1. WYNIKI ILOŚCIOWEJ ANALIZY BADANYCH PIERWIASTKÓW W WODZIE

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w wodzie pobranej z „zbiorników ekologicznych” zlokalizowanych przy trasie autostrady A2 (Nowy

Tomyśl – Stryków) w Wielkopolsce, przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Zawartość badanych pierwiastków w wodzie z tzw. „zbiorników ekologicznych”

Lokalizacja stanowiska	kadm ppm	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	ołów ppm
„zbiornik ekologiczny A2-1” w okolicy Żerniki	0,00	102,13	12,18	2,61	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-2” w okolicy Komorniki	0,00	27,44	18,12	2,76	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-3” w okolicy Krzyżowniki - Kleszczewo	0,00	60,75	19,91	2,67	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-4” w okolicy Krzyżowniki	0,00	20,66	2,12	2,79	0,01
„zbiornik ekologiczny A2-5” w okolicy Krzyżowniki	0,00	13,24	4,18	2,80	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-6” w okolicy wsi Bugaj (występowała U. cf. flexuosa)	0,00	147,60	18,95	2,57	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-7” w okolicy Markowic (występowała U. cf. flexuosa)	0,00	70,12	21,35	2,69	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-8” w okolicy Markowice	0,00	62,19	14,76	2,52	0,01
„zbiornik ekologiczny A2-9” w okolicy Lipowice	0,00	48,86	3,52	2,73	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-10” w okolicy Zdziedowic	0,00	189,60	34,53	2,50	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-11” w okolicy Dominowa	0,00	25,22	15,41	2,68	0,01
„zbiornik ekologiczny A2-12” w okolicy Chwałszczyce	0,00	68,66	7,23	2,70	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-13” w okolicy Chociczki	0,00	13,85	2,19	2,80	0,00
„zbiornik ekologiczny A2-14” w okolicy Wrześni (występowała U. cf. flexuosa)	0,00	97,47	16,53	2,61	0,00

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w wodzie ze

strumienia Michałówka w Poznaniu przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Zawartości badanych pierwiastków w wodzie Michałówki.

Stanowisko: I/II (data poboru)	kadm ppm	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	ołów ppm
I (21.06)	0,00	71,66	15,94	0,00	0,00
I (28.06)	0,00	91,20	10,42	2,92	0,00
I (7.08)	0,00	52,45	6,65	2,93	0,01
I (17.08)	0,00	188,00	32,93	0,00	0,01
I (28.08)	0,00	56,64	7,33	3,00	0,00
I (5.09)	0,00	53,00	9,82	2,49	0,01
I (20.09)	0,00	108,13	13,46	0,01	0,00
II (14.06)	0,00	343,20	40,67	0,00	0,00
II (21.06)	0,00	139,07	22,31	0,01	0,00
II (28.06)	0,00	61,16	5,58	3,05	0,00
II (7.08)	0,00	45,91	8,67	2,59	0,00
II (17.08)	0,00	104,53	11,46	3,08	0,00
II (28.08)	0,00	70,69	11,56	2,57	0,01
II (5.09)	0,00	62,03	13,38	0,00	0,00
II (20.09)	0,00	49,74	8,75	3,04	0,00
II (28.09)	0,00	46,31	5,64	3,14	0,00

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w wodzie z strumienia Świętnica przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Zawartości badanych pierwiastków w wodzie Świętnicy.

(data poboru)	kadm ppm	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	ołów ppm
14.06	0,00	176,13	28,80	2,40	0,01
21.06	0,00	23,93	1,65	3,12	0,00
28.06	0,00	134,80	14,06	2,49	0,01
13.08	0,00	119,73	14,28	2,94	0,00
18.08	0,00	91,07	11,57	2,95	0,00
23.08	0,00	125,47	32,27	2,44	0,00
28.08	0,00	162,93	25,87	0,01	0,00

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w wodzie z strumienia Dworski Rów przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Zawartości badanych pierwiastków w wodzie z Dworskiego Rowu.

(data poboru)	kadm ppm	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	ołów ppm
14.06	0,00	124,93	32,53	0,01	0,00
21.06	0,00	102,27	20,20	2,94	0,00
17.08	0,00	76,91	18,57	2,47	0,00
5.09	0,00	42,27	8,45	0,00	0,00
20.09	0,00	43,73	5,91	3,08	0,05

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w wodzie z stawu Tuleckiego przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Zawartości badanych pierwiastków w wodzie stawu Tuleckiego

(data poboru)	kadm ppm	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	ołów ppm
14.06	0,00	74,49	10,68	2,95	0,00
17.06	0,00	61,66	10,21	2,98	0,01
20.06	0,00	50,73	8,69	3,08	0,01
21.06	0,00	124,67	33,73	0,00	0,01
7.08	0,00	139,33	27,60	2,44	0,00
28.08	0,00	52,81	8,39	3,05	0,00
5.09	0,00	71,24	13,16	2,93	0,00

Wyniki ilościowej zawartości badanych pierwiastków w wodzie glinianki we wsi Śródka przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Zawartości badanych pierwiastków w wodzie glinianki nieopodal wsi Śródka

(data poboru)	kadm ppm	wapń ppm	magnez ppm	nikiel ppm	ołów ppm
16.09	0,00	114,67	40,13	2,67	0,01

11. ANALIZA JAKOŚCIOWA PLECH *ULVA*

Analizę jakościową badanych pierwiastków w glonach *Ulva* przeprowadzono za pomocą spektrometrii XRF.

11.1 WYNIKI BADAŃ XRF

Badania glonów za pomocą spektrometrii XRF zostały przeprowadzone na spektrometrze PW4025/00 MiniPal.

Spektrometr MiniPal jest sekwencyjnym energodispersyjnym przyrządem analitycznym sterowanym za pomocą mikroprocesora do identyfikacji pierwiastków w próbkach stałych, ciekłych i sproszkowanych. Zakres analityczny tego aparatu zawarty jest w granicach od sodu do uranu.

Wszystkie próbki zielenic *Ulva* sp. zostały poddane analizie jakościowej na spektrometrze XRF. Wykonano po trzy analizy dla każdej próbki zielenicy. Każda z wykonanych analiz wszystkich próbek plech błonic potwierdziła zawartości oznaczonych wcześniej pierwiastków.

12. DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania nad oznaczaniem metali w wodzie stanowisk słodkowodnych oraz morskich form zielenic z rodzaju *Ulva* wykonano wykorzystując metodę **fluorescencji rentgenowskiej XRF** (ang. X-ray fluorescence), która jest jedną z najlepszych technik analitycznych, służących do analizy składu pierwiastkowego wszelkiego rodzaju próbek, zarówno stałych jak i ciekłych. XRF łączy w sobie najwyższą dokładność i precyzję z bardzo prostym i szybkim przygotowaniem próbek.

Wykonano także oznaczenia wybranych pierwiastków, z zastosowaniem techniki spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem plazmowym ICP-OES (ang. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy). Obie metody, zarówno XRF, jak i ICP, potwierdziły obecność metali takich jak: magnez, wapń, kadm, ołów oraz nikiel; zarówno w plechach błonic oraz w wodzie, z której pobierano próbki glonów.

Materiał badawczy pochodził z stanowisk zlokalizowanych w Polsce, jak i za granicą. Plechy pochodziły z ekosystemów półnaturalnych takich jak jeziora czy stawy oraz układów antropogenicznych takich jak zbiorniki przy autostradowe. Większość z badanych próbek plech pochodziły z populacji słodkowodnych gatunków z rodzaju *Ulva*. Do tej pory nie prowadzono badań nad zdolnością do akumulacji metali ciężkich przez plechy słodkowodnych form *Ulva*.

Przeprowadzone badania XRF pokazały, iż najwyższe stężenie we wszystkich analizowanych próbach plech *Ulva* wykazano dla wapnia. Zauważana jest znaczna różnica pomiędzy zawartością wapnia, a resztą pierwiastków. Wynik taki tłumaczy obecność znacznej ilości inkrustacji węglanu wapnia masowo zalegających na plechach badanych zielenic.

W próbie plech błonicy pochodzącej ze Zbiornika Maltańskiego w Poznaniu poza przeważającym stężeniem wapnia, wykryto obecność kadmu, rtęci oraz ołowiu. Zawartość kolejnych pierwiastków jak można zaobserwować na odpowiednim widmie XRF jest znikoma. Z widma XRF dla próbki plech pobranej z glinianki z okolic wsi Śródka pod Poznaniem; oprócz najwyższego stężenia wapnia, oznaczono znaczącą obecność kadmu, rtęci, ołowiu oraz żelaza. Najwyższe stężenie wapnia wyznaczono z próby plechy błonicy pobranej z „zbiornika ekologicznego” przy autostradzie A2 (trasa Nowy Tomyśl–Stryków) nieopodal wsi Bugaj. W plechach oznaczono prawie trzykrotnie mniejsze koncentracje takich metali jak: kadm, rtęć, czy ołów. Podobna sytuacja ukształtowała się na widmach XRF dla plech błonic pobranych z przy autostradowych „zbiorników ekologicznych” w okolicy Markowic oraz Wrześni. Nieco inaczej niż pozostałe widma kształtuje się widmo XRF dla plech błonic, które występowały w strumieniu Świątnica. Jak w przypadku poprzednich widm, największe stężenie wykazano dla wapnia, porównywalne wartości dla kadmu oraz żelaza. Wyznaczono również obecność rtęci dla tej próby. Z widma plech błonicy morskiej z Kołobrzegu wykazano, iż w najwyższej ilości skumulowany jest wapń. Stężenie kolejnych metali (ołowiu i rtęci) było około trzy - czterokrotnie mniejsze niż wapnia. W plechach błonic pobranych z litoralu morskiego (Gdynia) najwyższe stężenie wykryto dla wapnia, natomiast o około połowę mniej znajdowało się w tych plechach żelaza. Wykryto również obecność rtęci i ołowiu. Skład jakościowy widm z okolic plech słodkowodnych błonic z stawu Tuleckiego i jeziora Laskownickiego w Wągrowcu kształtuje się podobnie. Widać znacznie przeważające stężenie wapnia. Na widmach zaobserwowano bardzo znaczące różnice w stężeniach wapnia i kolejnych pierwiastków. Nawet pięciokrotnie mniej wykryto kadmu, rtęci i ołowiu. Morską formę błonic pobraną z wyspy Bornholm, cechowały największe stężenia wapnia w plechach. Kolejnymi metalami o znaczącym stężeniu były żelazo, kadm, rtęć oraz ołów. W widmie XRF z analizą składu plech błonic pochodzących z strumienia Dworski Rów, jest podobnie jak w przypadku pozostałych widm, można zaobserwować największe stężenie jonów wapnia. Zaznacza się również, iż w mniejszych ilościach kumulowane były jony kadmu, rtęci oraz ołowiu.

Przeprowadzone badania metodą ICP-OES wykazały, iż w plechach badanych zielenic i wodzie, z której zostały pobrane plechy kumulują się różne

ilości badanych pierwiastków. Szczególnie widoczne było to w przypadku stężenia wapnia i magnezu.

Biorąc pod uwagę znaczną zawartość wapnia oraz magnezu w plechach błonic pobranych z okolic autostrady A2 (Nowy Tomyśl - Stryków) oraz niewielką zawartość tych samych pierwiastków w zbiornikach wodnych, wyniki potwierdzają wysoką zdolność gatunków z rodzaju *Ulva* do wytwarzania inkaustów węglano-wapniowych. Porównując zawartość badanych pierwiastków w plechach ulw pochodzących ze stanowisk „zbiorników ekologicznych” znajdujących się przy autostradzie (kod próby: A-2, A2-6 i A2-14) można zauważyć, że ilości wapnia wynosiły kolejno: 182876,85 ppm; 247114,43 ppm oraz 215169,66 ppm. Natomiast w wodzie, która była pobrana z tych samych zbiorników co badane plechy wartości stężenia wapnia przedstawiały się następująco: 147,60 ppm; 97,47 ppm oraz 70,12 ppm. Podobne obserwacje można było zauważyć porównując stężenie magnezu w plechach zielenicy i w wodzie z przy autostradowych zbiornikach, z których zebrano zielenice. Dla stanowisk znajdujących się w rejonie autostrady (A2-6, A2-14, A2-7) stężenie magnezu w plechach przedstawiało się następująco: 2598,96 ppm (18,95 ppm), 4228,86 (16,53 ppm) oraz 3692,61 ppm (21,35 ppm). W nawiasach podano wartość stężenia magnezu w wodzie, w której rozwijały się błonice. Przedstawioną zależność pomiędzy stężeniami metali w plechach i zbiornikach wodnych potwierdzają kolejne również pozostałe uzyskane wyniki. Zawartość wapnia w błonicach pobranych z Dworskiego Rowu wyniosła 161414,57 ppm, natomiast ilość magnezu wyniosła 4451,78 ppm. Wartości pierwiastków są dużo wyższe, niż stężenie tych samych metali w ekosystemie, z którego pobrano badane zielenice. W wodzie Dworskiego Rowu znajdowało się kolejno (wynik uśredniony z różnych terminów poboru próbek): $\pm 79,62$ ppm wapnia oraz $\pm 16,26$ ppm magnezu. Rezultaty te pokazują, że ilość wapnia i magnezu notowane w plechach są wielokrotnie wyższe, niż koncentracje tych metali notowane w siedliskach, z których zostały pobrane.

Porównując obecność metali (ołów, nikiel i kadm) w próbkach plech ulwy pobranych z bliskiego sąsiedztwa autostrady A2 oraz z innych ekosystemów wodnych zauważa się również znaczącą różnicę w koncentracji tych metali między plechami a wodą. Zawartość niklu w plechach ze „zbiorników ekologicznych” nieopodal Bugaja, Markowic i Wrześni wynosiła kolejno: 118,95 ppm (2,57 ppm); 114,77 ppm (2,69 ppm) oraz 113,932 ppm (2,61 ppm). Wartości ołowiu w plechach ulwy pobranej ze zbiornika zlokalizowanego nieopodal wsi Bugaj wynosiła 1,50 ppm; z kolei ze zbiornika w okolicy Markowic - 8,48 ppm a Wrześni - 8,96 ppm. Najwyższe koncentracje kadmu odnotowano w zbiorniku we Wrześni - 44,78 ppm, w zbiornikach we wsi Bugaj i Markowice zanotowano

kolejno: 5,00 ppm i 4,99 ppm.

Morskie gatunki z rodzaju *Ulva* takie jak: *U. lactuca*, *U. reticulata*, *U. fasciata*, *U. rigida*, *U. compressa* czy *U. prolifera*, wykorzystane są z powodzeniem w monitoringu zanieczyszczeń wód morskich metalami ciężkimi [14]. Dzięki wysokiej zdolności w.w. gatunków błonic do bioakumulacji metali ciężkich stały się one w ostatnim dziesięcioleciu cieszącym się znacznym powodzeniem bioindykatorem skażeń środowiska. Nie prowadzono jak dotąd badań związanych z wykorzystaniem słodkowodnych populacji błonic w monitoringu zanieczyszczenia wód metalami. Powodem takiej sytuacji jest fakt nielicznego występowania odnawialnych populacji tych pierwotnie morskich gatunków błonic w wodach słodkich. Jak dotąd zidentyfikowano jedynie ok. 100 stanowisk słodkowodnych form ulwy w Świecie na stanowiskach zlokalizowanych w głębi kontynentów [13].

Niniejsza praca miała również na celu wstępną analizę zdolności do akumulacji wybranych metali przez słodkowodne formy ulwy w porównaniu do populacji morskich. Dalsze badania nad możliwością aplikacyjnego wykorzystania błonic w monitoringu skażeń słodkowodnych ekosystemów metalami ciężkimi będą prowadzone na stanowiskach tych gatunków zlokalizowanych na terenie Wielkopolski. Prace będą obejmowały analizę składu ilościowego i jakościowego metali w trzech typach prób: (i) w plechse błonic, (ii) wodzie pobranej z ich siedliska oraz (iii) z osadu gromadzącego się pod plechami. Znane są bowiem przypadki istotnych statystycznie korelacji pomiędzy zmianami koncentracji metali w plechach a osadem, które opisano na przykładzie ekosystemów przymorskich [14]. Prawdopodobnie występują podobne zależności także w ekosystemach słodkowodnych, w których notuje się masowy pojaw plech *Ulva*.

Badania realizowano w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr N N304 0134 37) pt. „Weryfikacja genetyczna i siedliskowa gatunków z rodzaju *Ulva* na terenie Polski”.

13. LITERATURA

1. Olszowiec P.: „Beta test set for emission-fighting algae bioreactor”, Power Engineering 11/2004
2. Van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M. An introduction to phycology, Cambridge University Press, First edition 5-623, 1995
3. Lee R. E. Cambridge University Press, 614pp, Phycology, 1999
4. South R.G., Whittick A., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, 341pp, Introduction to Phycology, 1996

5. Gumiński S.: „*Fizjologia glonów i sinic*” Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 1990
6. Messyasz B., Rybak A.: „Charakterystyka morfometryczna i siedliskowa mikrozielenicy *Ulva prolifera* O.F. Müller J. Agardh 1883 (*Chlorophyta*, *Ulvophyceae*) na słodkowodnym stanowisku w Wielkopolsce” *Chrońmy Przyrodę Ojczystą* 65 (5), 2009
7. Messyasz B., Rybak A.: „Występowanie makroglonów z rodzaju *Ulva* w Wielkopolsce” *Badania fizjograficzne nad Polską Zachodnią. Seria B – Botanika*, tom 58, 2009
8. Szpunar J., Łobiński R.: „Spektrometria masowa z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP MS)” *Praca zbiorowa, Zastosowanie metod spektrometrii atomowej w przemyśle i ochronie środowiska*, Warszawa, IChF PAN 1999
9. Cygański A.: „Metody spektroskopowe w chemii analitycznej”, Wydawnictwo Techniczno-Naukowe 2009
10. Szczepaniak W. : „Metody instrumentalne w analizie chemicznej” , Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1996
11. www.ftj.agh.edu.pl
12. www.metalogis.pl
13. Messyasz B., Rybak A.: „Nowe źródłowe stanowiska halofilnej zielenicy *Enteromorpha compressa* (L.) Ness w Polsce” *Badania fizjograficzne nad Polską Zachodnią. Seria B- Botanika*, tom 57, 2008
14. Villares V., Puente X., Carballeira A.: “*Ulva* and *Enteromorpha* as indicators of heavy metal pollution” *Hydrobiologia* 462: 221-231, 2001

Rozdział II

CHARAKTERYSTYKA INKRUSTACJI POKRYWAJĄCYCH PLECHY SŁODKOWODNEJ FORMY ZIELENICY ULVA (ULVACEAE, CHLOROPHYTA)

Beata Messyasz¹, Andrzej Rybak¹, Bogusława Łęska² i Marta Pikosz¹

¹*Zakład Hydrobiologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Instytut Biologii Środowiska, Wydział Biologii, Umultowska 89, 61 – 614 Poznań, Polska*

²*Zakład Chemii Supramolekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, Grunwaldzka 6, 60 – 780 Poznań, Polska*

1. WSTĘP

Powstawanie inkrustacji węglanu wapnia na pędach roślin wodnych zachodzi jako efekt przeprowadzania procesu fotosyntezy w wodach zasadowych [Dodson, 1974]. Powstawanie inkrustacji na pędach roślin wodnych jest procesem zachodzącym szczególnie intensywnie w wodach o wysokim pH. Zwapnienie jako proces osadzania się soli wapnia jest obserwowany również na powierzchni glonów. Odkładanie się węglanu wapnia może zachodzić w różnych miejscach komórki: na zewnątrz, wewnątrz jak i między nimi [Borowitcka, 1982].

Ramienice (*Characeae, Chlorophyta*) produkują kompleksy węglanu wapnia, które masowo pokrywają powierzchnię ich komórek [Browlee i Taylor, 2002]. Mechanizm zwapniania plech ramienic został w pełni opisany i zbadany [Hutchinson, 1975; Królikowska, 1997]. Ramienice do przeprowadzenia procesu fotosyntezy zdolne są do pobierania węgla z wodorowęglanów, które przy dostępności wolnych jonów Ca^{2+} wytrącają się na powierzchni w postaci CaCO_3 . Intensywne wydzielanie i odkładanie CaCO_3 ma miejsce w zasadowych rejonach plech, w których dochodzi do poboru jonów wodorowych, które są z kolei wykorzystywane w obszarach kwaśnych plechy do pobrania CO_2 z jonów

wodorowęglanowych [Pełechaty, 2004]. Hutchinson [1975] i Królikowska [1997] podczas prowadzonych badań nad łąkami ramienicowymi stwierdzili, iż zawartość węglanu wapnia stanowi ponad 50% całkowitej suchej masy tych makroglonów. Natomiast Siong i Asaeda [2009] udowodnili, iż stopień zwapnienia wzrasta wraz z wiekiem glonów. Zawartość węglanów wzrasta znacząco od najmniejszej u młodej plechy do największej u dojrzałej plechy. Zwrócono także uwagę, że kalcyfikacja powoduje spadek intensywności wzrostu rzeczywistej biomasy ramienic [Pełechaty, 2004].

Poza wspomnianymi ramienicami zjawisko wytrącania węglanu wapnia zaobserwowano także u innej grupy zielenic, reprezentowanej przez słodkowodne gatunki z rodzaju *Ulva* (syn. *Enteromorpha* – taśma, błonica, watka) [Messyasz i Rybak, 2009a]. Do tej pory badania prowadzone nad makrozielenicami z rodzaju *Ulva* (*Ulvaceae*, *Chlorophyta*) skupiały się na biogeografii, ekologii i morfologii tych glonów oraz strukturze peryfitonu okrzemkowego zalegającego na plechach *Ulva*. Dotychczas nie podejmowano analiz dotyczących wpływu kompleksów kryształów CaCO_3 na rozwój plechy *Ulva* jak i na kształtowanie się biomasy rzeczywistej w czasie trwania ich cyklu rozwojowego.

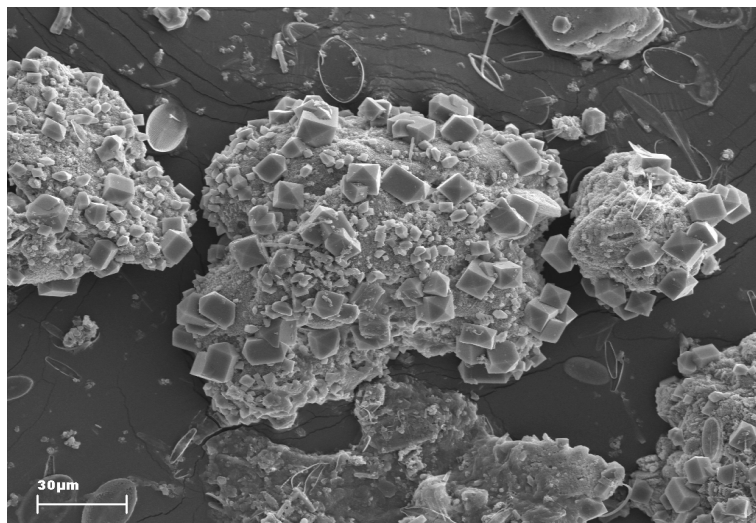
Celem prowadzonych badań była charakterystyka składu ilościowego i jakościowego inkrustacji pokrywających plechy słodkowodnych populacji *Ulva* występujących na terenie Wielkopolski. Określono również skład suchej i świeżej masy makroglona z wyszczególnieniem ich udziału w kształtowaniu biomasy; peryfitonu okrzemkowego oraz kryształów soli wapnia. Zwrócono również szczególną uwagę na różne typy morfologiczne kryształów, wytrącających się na powierzchni plech badanej zielenicy.

2. OBIEKT BADAŃ

Obiektem badań były kryształy węglanu wapnia, które zalegały w dużych ilościach na powierzchni plech zielenic z rodzaju *Ulva* (fot. 1), występujących na stanowiskach śródlądowych w Wielkopolsce.

2.1. PROCES KRYSTALIZACJI

Kryształizacja jest to proces powstawania fazy krystalicznej z fazy ciekłej bądź też gazowej, w którym wyróżnia się dwa etapy: powstawanie zarodków krystalizacyjnych oraz wzrost kryształów. Pierwszy etap zarodkowania (enukleacji) rozpoczyna się, gdy w trakcie wzrostu stężenia substancji



Fot. 1. Wyizolowane kryształy z powierzchni plechy *Ulva prolifera* (fotografia wykonana przy użyciu SEM) (lipiec 2008, fot. B. Messyasz i A. Rybak).

rozpuszczonej jej cząsteczki zaczynają grupować się w klastry¹. Po wytworzeniu stabilnych zarodków fazy krystalicznej zaczyna się następny etap, którym jest wzrost kryształów. Rozpoczyna się przez rozbudowanie sieci krystalicznej w efekcie przyłączenia do powierzchni zarodka jednego po drugim elementów kryształu takich jak jony, cząsteczki, warstwa po warstwie. Podczas wytrącanie fazy krystalicznej, mogą zachodzić dodatkowo tzw. procesy wtórnego zarodkowania, czyli starzenie kryształów oraz ich agregacja, połączone z rekrystalizacją czy rozpuszczeniem wytrąconych kryształów. Procesy wtórne w znacznym stopniu wpływają na morfologię i rozmiar wytrąconych cząstek fazy krystalicznej [Sonntag, 1982; Glynn i Reardon, 1990].

Zgodnie z regułą stopniowości Ostwalda [Mullin, 2004], która głosi, iż większe kryształy tworzą się w wyniku rozpuszczania małych kryształów, najpierw wytrąca się forma najmniej stabilna termodynamicznie, która ulega przekształceniu w formę bardziej trwałą. Czynnikiem wpływającym na przebieg procesu jest początkowa wartość pH, która wpływa na morfologię otrzymywanego CaCO_3 . W warunkach silnie zasadowych pH około 12, następuje wytrącanie nieregularnych, mniejszych kryształów, a przy stosunkowo niskich wartościach pH ok. 9 zmiana romboedryczna morfologii kalcytu jest nieznaczna. Wielkość

¹ „Klaster to struktura nadcząsteczkowa, w której istnieją dwie grupy cząstek, które tworzą wspólną sieć powiązań” (Sonntag, 1982).

wytrąconych cząstek zależy od stopnia przesylenia w roztworze. Ze wzrostem temperatury widoczna jest tendencja do powstawania mniejszych kryształów, związane jest to z procesem rozpuszczania kalcytu pod wpływem wyższych temperatur [Feng i in., 2007].

2.2. ZWAPNIENIE PLECH GLONÓW

Odkładanie soli wapnia (kalcyfikacja) jest wspólne dla wielu gatunków glonów żyjących zarówno w środowisku słodkowodnym, jak i morskim. Węglan wapnia jest odkładany w różnych postaciach, jako aragonit bądź kalcyt. Różne rodzaje glonów wykazują odmienne przystosowania do przeprowadzania mechanizmu wytrącania kryształów. Na podstawie badań krystalograficznych, umiejscowienia i organizacji wytrąconych kryształów wyróżnić można takie rodzaje strącania jak: (i) zewnątrzkomórkowe, gdzie kryształy osadzają się po zewnętrznej stronie komórek, (ii) wewnątrzkomórkowe - inkrustacja zachodzi od środka, a także (iii) - międzykomórkowe [Borowitcka, 1982].

Zewnątrzkomórkowe wytrącanie kryształów

Najbardziej obrazowym przykładem tego sposobu wytrącania się kryształów są słodkowodne zielenice z rodzaju *Chara*. W tym przypadku kryształy tworzą zespoły na powierzchni ścian cylindrycznych komórek. Obecność tych zespołów związana jest z lokalizacją miejsc zasadowych, gdzie pH wynosi 9,5-10,5. Podczas, gdy obserwowane są nagłe zmiany pH, przejście z obszarów pozbawionych kryształów do obszarów ich występowania jest stopniowe. Odkładane kryształy węglanu wapnia są kształtu przypominającego piramidy do prostokątnego o szerokości w przedziale od 6 do 10 μm i długości od 6 do 27 μm [Borowitcka, 1982].

W środowisku słodkowodnym, oprócz wspomnianych ramienic taki sposób inkrustacji węglanem wapnia, spowodowanej zmianą pH, obserwowany jest także wśród gatunków z rodzaju *Chaetomorpha*, *Gongrosira* i *Oedogonium* [Borowitcka, 1982].

Wewnątrzkomórkowe wytrącanie kryształów

Kryształy CaCO_3 są formowane pomiędzy komórkami, ale po ich zewnętrznej stronie - jest to specyficzny rodzaj zewnątrzkomórkowego wytrącania. Mechanizm ten najlepiej jest poznany na przykładzie morskiego gatunku z rodzaju *Codiales*, np. *Halimeda*, gdzie inkrusty powstają w formie aragonitu w kształcie igieł. Aragonitowe igły mają równoległe ściany w stosunku do swojej długości, zwykle stożek leży w pobliżu ich końca, ale rzadko dochodzi do tego

punktu. W zależności od gatunku i prawdopodobnie od warunków wzrostu mogą osiągać następujące rozmiary: 0,08 – 0,6 μm szerokości i powyżej 10 μm długości oraz nie przekraczają 0,01 μm grubości [Borowitzka, 1982].

Międzykomórkowe wytrącanie kryształów

Ten sposób powstawania kryształów występuje wśród jednokomórkowych glonów z podgromady *Coccolithophorineae* (*Chrysophyta*), tak zwanych kokolitów. Produkcja węglanów występuje tylko na niektórych etapach cyklu życiowego. Kokolity są zbudowane z pojedynczych kryształów węglanu wapnia, zazwyczaj w postaci izomorficznej odmiany kalcytu [Borowitzka, 1982]. Aby powstał jeden kokolit potrzeba jednej godziny [Paasche, 1964]. Pobranie jonów wodorowęglanowych do wnętrza może zachodzić bez nakładu energii, natomiast pobranie kationów wapniowych łączy się z istnieniem bariery energetycznej. W ten sposób zachodzi alternatywny transport, gdzie Ca^{2+} łączy się z cukrem lub białkiem i w ten sposób zachodzi kalcyfikacja [Brownlee i Taylor, 2002].

Wśród glonów istnieje aż pięć grup, u których obserwowany jest proces wytrącania węglanu wapnia. Przedstawiciele grup *Chlorophyta*, *Rhodophyta* i *Phaeophyta* (rodzaj *Padina*) wytrącają wyłącznie aragonit. Natomiast *Chrysophyta* i *Cyanophyta* wytwarzają wyłącznie kalcyt [Dodson, 1974]. Glony z silnie inkrustowanymi ścianami komórkowymi napotykać na liczne ograniczenia, do najważniejszych należą spowolniony rozwoju komórek, jak i zahamowany wzrost. Natomiast w przypadku gatunków z rodzaju *Padina* odnotowano pozytywny wpływ zjawiska kalcyfikacji, ponieważ węglan wapnia stanowi wsparcie mechaniczne dla plechy [Miyata i in., 1977]. Gatunki z rodzaju *Padina* (*Phaeophyceae*, *Dictyotales*) wytrącają kryształy w postaci ułożonych koncentrycznie kryształów aragonitu na powierzchni plechy. Po przeprowadzonej analizie kryształy osiągają 2- 3 μm długości i 0,2 μm szerokości. Zawartość węglanu wapnia w postaci aragonitu stanowi aż 11% suchej masy [Okazaki i in., 1986].

2.3.MECHANIZM WYTRĄCANIA WĘGLANU WAPNIA

W literaturze opisanych jest kilka mechanizmów tworzenia się krystalicznego węglanu wapnia. Ogólny mechanizm wytrącania węglanu wapnia na plesze gatunku *Enteromorpha nana* (obecna nazwa gatunku: *Ulva nana*) opisał w swojej pracy Dodson (1974). Wykazał on, iż ciasno upakowane kanaliki plechy pobierają jony HCO_3^- z wody, a do wnętrza komórek wydzielają jony CO_3^{2-} . Przez co obserwowany jest ogromny wzrost produktu jonowego [Ca^{2+}] i [CO_3^{2-}] w wodzie znajdującej się wewnątrz plechy, który z kolei prowadzi do wytrącania

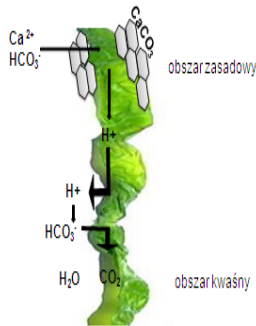
aragonitu, który kumuluje się u podstawy tubularnej plechy.

Bardziej szczegółowy opis strącania kryształów przedstawiają w swoich pracach McConnaughey (1997) oraz Suzuki (1998), którzy wiążą występowanie tego zjawiska z procesem fotosyntezy (stosunek obu procesów wynosi 1:1). Już w 1990 roku Barnes i Chalker stwierdzili, że proces kalcyfikacji zachodzący na morskich roślinach i glonach jest stymulowany przez fotosyntezę. Wyróżnia się występowanie dwóch typów zależności pomiędzy kalcyfikacją, a fotosyntezą, tak zwaną kalcyfikację *cis* i *trans*. W warunkach dobrego naświetlenia występuje *Cis* – kalcyfikacja, która zachodzi po tej samej stronie organizmu, co pobieranie węgla do procesu fotosyntezy ze względu na zasadowy charakter wody. W tym przypadku wytrącanie CaCO_3 zachodzi w celu zachowania równowagi węglanowej podczas fotosyntezy [McConnaughey i Falk, 1991; McConnaughey, 1997; Suzuki, 1998]. Natomiast odmiana *trans* spowodowana jest transportem jonów wzdłuż organizmu, podczas aktywnego mechanizmu przy użyciu energii z ATP. Jony wapniowe wypływają, a na ich miejsce pobierane są jony wodorowe, przez co roztwór staje się bardziej zasadowy. W wyniku połączenia jonów wodorowęglanowych z jonami wapnia następuje wytrącenie węglanu wapnia [McConnaughey i Falk, 1991; McConnaughey, 1997; Suzuki, 1998]. W 1997 roku Larsoon i inni badacze zasugerowali istnienie, dla morskich makroglonów z rodzaju *Ulva* sp., transportu błonowego dla jonów HCO_3^- ułatwionego przez system antyportu $\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$, podczas którego przepływ jonów jest wspierany przez wymianę anionów białek.

W procesie zwapnienia powstają dwa rodzaje produktów - minerały CaCO_3 i protony H^+ według poniższego równania: $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 \downarrow + \text{H}^+$

W wodach o charakterze zasadowym rozpuszczony nieorganiczny węgiel występuje głównie w formie jonów HCO_3^- , który jest głównym źródłem węgla podczas kalcyfikacji [Brownlee i Taylor, 2002]. Niestety wodorowęglan jest dostępny tylko przy obecności protonów wodorowych. Glony pobierają wtedy CO_2 z HCO_3^- (w rejonie kwaśnym), czemu towarzyszy pobieranie H^+ (w rejonie zasadowym) - też z HCO_3^- w wyniku tego w wodzie pozostaje jon węglanowy, który łączy się z jonami wapnia obecnymi w wodzie i na powierzchni plechy wytrąca się osad krystalicznego węglanu wapnia (ryc. 1) [McConnaughey, 1997].

Tworzenie zespołów węglanowych na powierzchni komórek związane jest z istnieniem obszarów kwaśnych i zasadowych otaczających te komórki. Rejony zasadowe spowodowane są przez wpływ jonów OH^- , które wydają się być związane z HCO_3^- pobieranymi na potrzeby fotosyntezy. Wpływ jonów wodorowych powoduje wytrącanie węglanu wapnia w twardej wodzie [Pentecost, 1984].



Ryc. 1. Model mechanizmu wytrącania zespołów kryształu węglanu wapnia na powierzchni plech słodkowodnych zielenic z rodzaju *Ulva* opracowany na podstawie modelu Brownlee i Taylor [2002] zaproponowanego dla ramienic.

3. METODY BADAŃ

3.1. PRACE TERENOWE

Próby plech *Ulva* zostały pobrane w okresie letnim w 2009 roku z jezior, stawów i strumieni zlokalizowanych na terenie Wielkopolski. Próby plech pobrano z następujących ekosystemów: J. Maltańskie (N 52° 24' 10,5" E 16° 57' 45,2"), staw Tulecki (N 52° 20' 35" E 17° 04' 40"), glinianka we wsi Śródka (N 52° 17' 45,9" E 17° 07' 06,1"), zbiornik ekologicznych A2-14 (N 52° 18' 47,8" E 17° 32' 28,4"), A2-6 (N 52° 18' 25,8" E 17° 10' 11,2") i A2-7 (N 52° 18' 34,4" E 17° 14' 07,3"), strumień Dworski Rów (N 52° 21' 28" E 17° 02' 30") oraz Świątnica (N 52° 21' 37" E 17° 02' 40").

Próbę plechy o wadze ± 500 g po pobraniu z danego stanowiska osuszano na bibule przez 10 min. i umieszczono następnie w szczelnym plastikowym pojemniku. Próby niezwłocznie przenoszono do chłodziarki terenowej (4°C), następnie po przewiezieniu prób do laboratorium umieszczono je w lodówce (-10°C). Z stanowisk, w których pobrano próby plech, pobrano również próbę wody. Próbę wody o objętości 90 ml nalano do szczelnych plastikowych pojemników o objętości 100 ml. Próby wody konserwowano 10 ml stężonego kwasu azotowego (V).

3.2. PRACA LABORATORYJNA

Metody oznaczania zawartości wapnia

Badania zawartości jonów w inkrustacjach jak i ich stężenia w wodzie przeprowadzono w Zakładzie Chemii Supramolekularnej na Wydziale Chemii UAM. Skład jakościowy prób plech oraz wody badano za pomocą spektrometrii XRF. Natomiast analizę ilościową wszystkich prób wykonano przy użyciu spektrometrii ICP-MS. Przed przystąpieniem do pomiarów próbki plech suszono i następnie poddano mineralizacji. Próbki plech o znanej wadze naniesiono za pomocą plastikowej łyżeczki do teflonowych bomb. Następnie do każdej z prób dodano 15 ml stężonego kwasu azotowego (V) i 5 ml 30% H_2O_2 . Tak przygotowane próby poddano dwustopniowej ciśnieniowej mineralizacji mikrofalowej w układzie zamkniętym. Mineralizację przeprowadzono w piecu MarsXpress. Pierwszy etap mineralizacji przeprowadzono przy następujących parametrach: moc [W]= 400, siła [%]= 80, czas [s]= 300; z kolei w drugim etapie zwiększono siłę do 100%.

Metody oznaczenia suchej masy kryształów

Określono całkowitą świeżą masę plech zielenicy pobraną w 30 powtórzeniach ze stawu Tuleckiego nieopodal Poznania. Oddzielono porcję ± 300 g plechy. Następnie rozłożono ją równomiernie na bibule i pozostawiono do przeschnięcia na 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie odważono po ± 10 g materiału badawczego (n= 30). Otrzymałą wagę oznaczono jako całkowitą świeżą masę. W celu uzyskania suchej masy zważone wcześniej plechy poddano procesowi suszenia. Naczynia, w których znajdowały się zważone plechy przeniesiono do suszarki komorowej i poddano procesowi suszenia w temperaturze 200°C przez 1h. Do określenia procentowej zawartości wody w plechzie zastosowano poniższy wzór: $\%H_2O = \frac{\text{całkowita świeża masa} - \text{całkowita sucha masa}}{\text{całkowita świeża masa}} \cdot 100\%$.

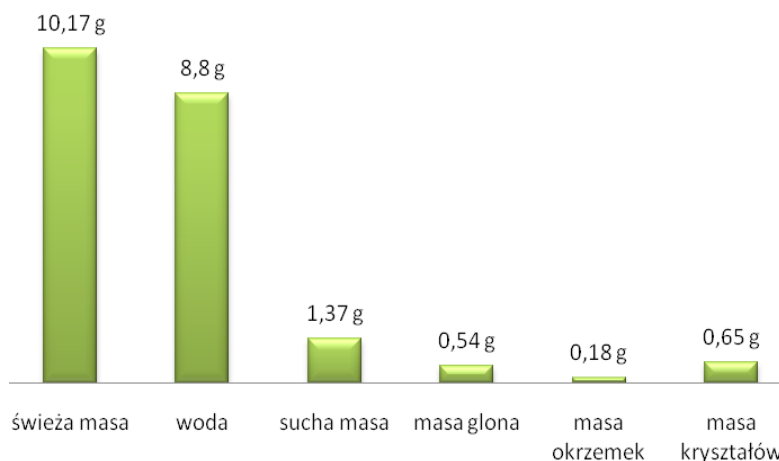
Określono następnie suchą masę kryształów i okrzemek, które występują na powierzchni plech. W tym celu wysuszone uprzednio próby pokruszono tłuczkiem moździerzowym i przeniesiono do szklanych probówek. Próby zalano 9 ml nadtlenuku wodoru w celu strawienia żywych komórek zielenicy. Następnie próbki umieszczono w cieplarni w temperaturze 95°C na 6h. Po upływie tego czasu ponownie dodano 2 ml nadtlenuku wodoru i powtórnie umieszczono próby w cieplarni (95°C) na 3h. Próby zważono, a otrzymane wyniki oznaczono jako suchą masę kryształów i okrzemek.

Kolejny etap polegał na uzyskaniu suchej masy okrzemek. Polegał on na zalaniu prób, które przelano do szczelnych plastikowych pojemników,

rozcieńczonym kwasem solnym (5 ml) w celu rozpuszczenia kryształów węgla wapnia. Próby wytrząsano, przez 48 h. Następnie próby przelano do probówek i dopełniono wodą destylowaną do jednakowej objętości. Próby odwirowano przez 15 minut w wirówce typu MPW-212. Zlano nasącz, a następnie próby, w ten sam sposób poddano drugi raz wirowaniu. Po kolejnym usunięciu nadsączu, pozostały na dnie probówek osad, przeniesiono do pojemników wykonanych z folii aluminiowej i suszono w temperaturze 105°C przez 2 h. Otrzymaną suchą masę zważono na wadze laboratoryjnej, a uzyskane wyniki oznaczono jako suchą masę okrzemek. Po odjęciu od suchej masy kryształów i okrzemek suchej masy okrzemek, uzyskano masę kryształów węgla wapnia, które zalegały na i w plechach *Ulva*.

4. WYNIKI

Średnie wartości masy uzyskane podczas prowadzenia wieloetapowej procedury usuwania wody, części organicznych i nieorganicznych z plechy *Ulva* (ryc. 2). Średnia waga wyjściowa świeżej masy plech makroglona przed obróbką termiczną i chemiczną wynosiła ± 10 g. Po I etapie przeprowadzonej procedury masa zmniejszyła się 10 – krotnie (ryc. 2). W skład pozostałej po procesie suchej masy wchodziła właściwa waga glona, która stanowiła jedynie 1/20 świeżej masy. Większy udział w składzie masy miały kryształy, które stanowiły prawie połowę uzyskanej suchej masy.

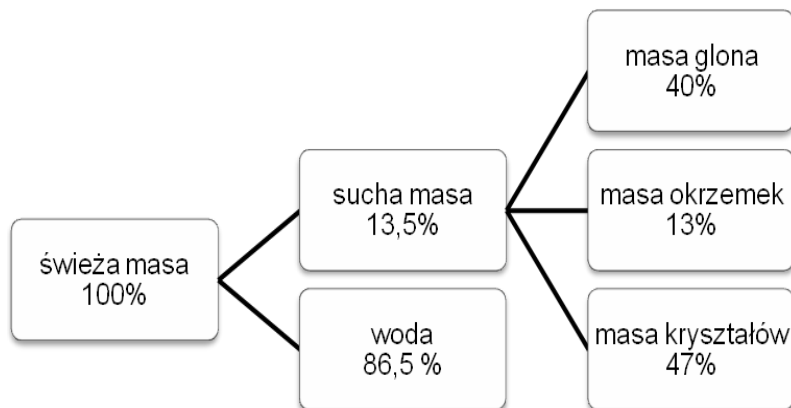


Ryc. 2. Średnie masy frakcji organicznych i nieorganicznych tworzących masę plech *Ulva* ($n=30$).

Plechy badanych słodkowodnych form *Ulva* charakteryzują się dużą zawartością wody w stosunku do całkowitej świeżej masy. Woda stanowi $\pm 85\%$ świeżej masy zielenicy. Pozostała część to sucha masa, w której skład wchodzi masa komórek zielenicy, peryfitonowych okrzemek oraz wytraconych kryształów (tab. 1, ryc. 3).

Tabela 1. Wartości mas kolejnych produktów plechy *Ulva* ($n = 30$).

Produkty procesu	Jednostka	Min.	Max.	SD
świeża masa	[g]	9,9085	10,5836	0,4774
woda	[g]	0,4569	0,8438	0,2736
sucha masa	[g]	0,9697	2,0028	0,7305
masa okrzemek	[g]	0,0407	0,3643	0,2288
masa kryształów	[g]	0,4569	0,8438	0,2736
masa komórek glona	[g]	0,2727	1,2582	0,6969



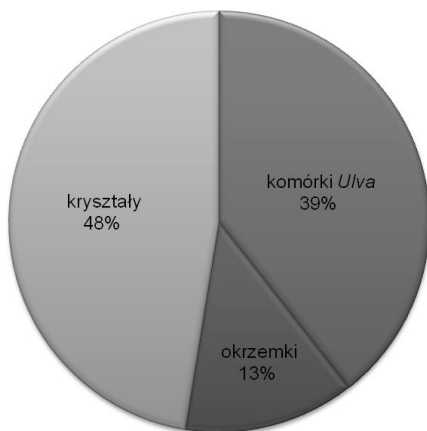
Ryc. 3. Skład świeżej masy plech słodkowodnej formy *Ulva*.

Udział procentowy poszczególnych elementów wchodzących w skład świeżej masy badanej zielenicy przedstawia ryc. 4. Poza wodą, która stanowi prawie 9/10 całkowitej świeżej masy, w skład świeżej masy wchodzi kryształy; których udział wyniósł 6%, a więc o 1% więcej niż masa komórek *Ulva*. Odnotowano tylko 2%-towy udział okrzemek epifitycznych w zawartości świeżej masy *Ulva*.



Ryc. 4. Udział procentowy składowych tworzących świeżą masę *Ulva*.

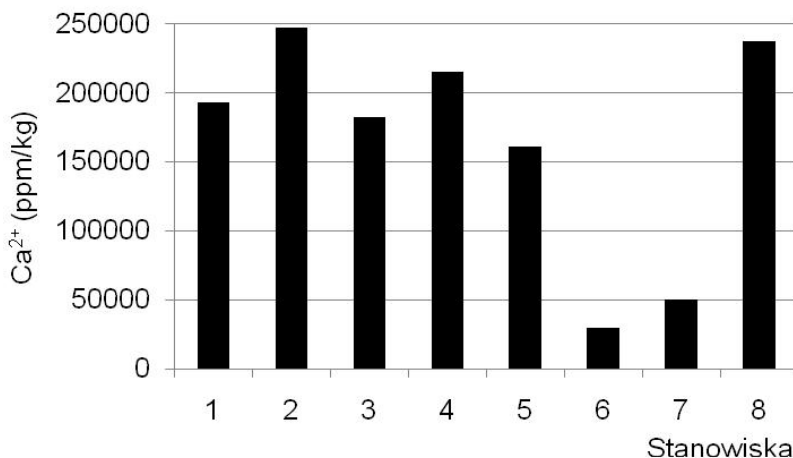
Największy udział w zawartości suchej masy posiadały kryształy, które stanowiły prawie połowę masy substratu (48%). Natomiast pozostałą część suchej masy tworzyły w niewielkiej ilości pancerzyki okrzemek (13%) i komórki zielenicy *Ulva* (39%) (ryc. 5).



Ryc. 5. Udział procentowy składowych tworzących suchą masę *Ulva*.

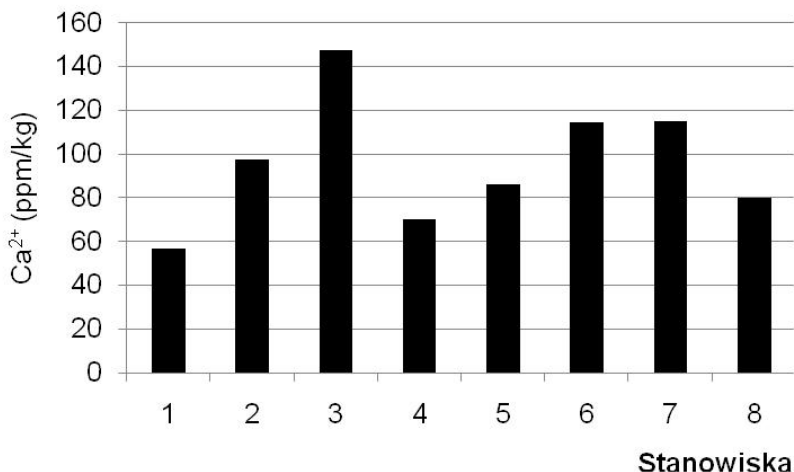
4.1. KONCENTRACJE JONÓW WAPNIA

Koncentracje wapnia w inkrustach pokrywających plechy *Ulva* wynosiły od 50399,2 do 247114,43 ppm Ca^{2+} /kg suchej masy zielenicy. Najwyższe stężenia wapnia odnotowano w plechach pochodzących ze zbiornika ekologicznego A2-14 oraz stawu w Tulcach. Z kolei najniższe stężenia wapnia zanotowano w plechach z strumienia Świątnica i glinianki we wsi Śródka (ryc. 6).



Ryc. 6. Koncentracje wapnia z inkrustów zalegających na plechach *Ulva* (1- Jezioro Maltańskie, 2- Zbiornik ekologiczny A2-14, 3- Zbiornik ekologiczny A2-6, 4- Zbiornik ekologiczny A2-7, 5- strumień Dworski Rów, 6- glinianka Śródka, 7- strumień Świątnica, 8- staw Tulce).

W wodzie, w której rozwijały się populacje *Ulva* notowano zdecydowanie niższe koncentracje wapnia niż w plechach. Koncentracje wapnia mieściły się w zakresie od 56,637 do 147,6 ppm Ca^{2+} /l wody. Najwyższe stężenie wapnia odnotowano w zbiorniku ekologicznym A2-6 a najniższe w wodzie pobranej z Jeziora Maltańskiego (ryc. 7). Średnie koncentracje wapnia w plechach *Ulva* są o ± 1700 razy wyższe niż stężenia wapnia notowane w wodzie, w których występowały badane zielenice.

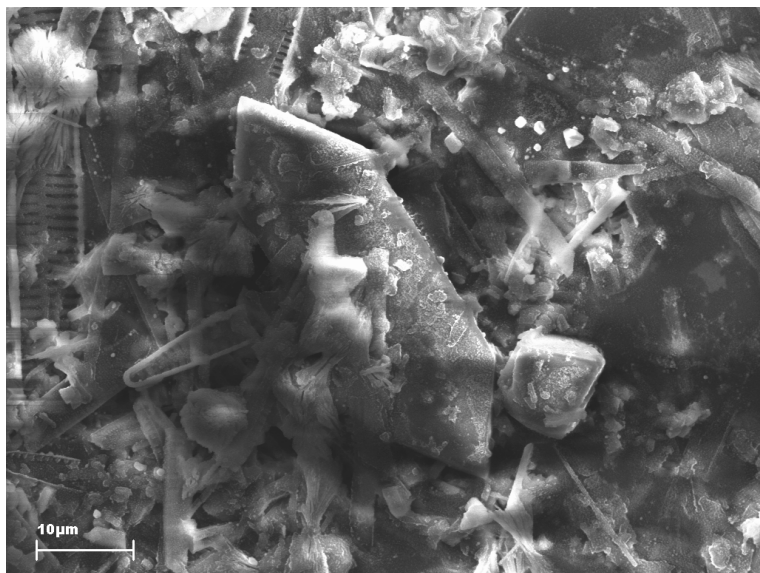


Ryc. 7. Koncentracje wapnia z wody w której występowały plechy *Ulva* (1- Jezioro Maltańskie, 2- Zbiornik ekologiczny A2-14, 3- Zbiornik ekologiczny A2-6, 4- Zbiornik ekologiczny A2-7, 5- strumień Dworski Rów, 6- glinianka Śródka, 7- strumień Świętnica, 8- staw Tulce).

4.2. MORFOLOGIA KRYSZTAŁÓW

Zdjęcia skaningowe wykonano przy użyciu mikroskopu skaningowego (SEM) w Wydziałowej Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej Wydziału Biologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Zdjęcia pozwoliły na charakterystykę budowy kryształów węglanowych, które mają zasadniczy udział w składzie masy słodkowodnych glonów z rodzaju *Ulva*.

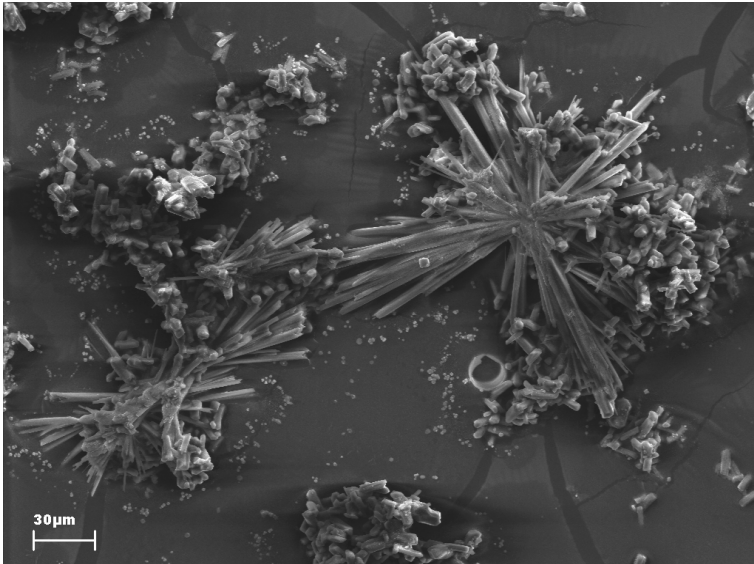
W próbach kryształów zidentyfikowano pojedyncze kryształy węglanu wapnia w kształcie sześciangu o ostrych zakończeniach, które miały długość $\pm 42,5 \mu\text{m}$ i szerokość w $12,5 \mu\text{m}$ (fot. 2), jak i zespoły kryształów o podobnych rozmiarach i budowie (fot. 3). Kryształy te nie były zaostrome, co powodowało, że były one krótsze ($\pm 14 \mu\text{m}$ długości i $\pm 4,8 \mu\text{m}$ szerokości). Całkowicie odmienną budowę cechowały się kryształy ułożone w kształt rozety, które miały postać bardzo długich i cienkich igieł (fot. 4). Kryształy te osiągały $\pm 105 \mu\text{m}$ długości i zaledwie $\pm 6 \mu\text{m}$ szerokości.



Fot. 2. Kryształ węglańu wapnia (kwiecień 2010, fot. B. Messyasz i A. Rybak).



Fot. 3. Zespól kryształów soli wapniowych (kwiecień 2010, B. Messyasz i A. Rybak).



Fot. 4. Zespół kryształów CaCO_3 w postaci długich igieł (kwiecień 2010, B. Messyasz i A. Rybak).

Pomiary długości i szerokości pojedynczych kryształów węgla wapnia wykonano na podstawie obrazu spod mikroskopu świetlnego (typu Axioskop 2 MOT firmy Zeiss). Uzyskane wyniki pomiarów podzielono na dwie kategorie. Do pierwszej grupy zaliczono kryształy dłuższe od $100\ \mu\text{m}$, które wykazywały co najmniej 10 razy większy stosunek długości do szerokości. Swoim kształtem przypominały cienkie a zarazem długie igły o nieregularnych końcach. Natomiast do drugiej grupy zaliczono kryształy w kształcie heksaedru, których długość była około 5 krotnie większa od szerokości. W tabeli 2 zaprezentowano przykładowe fotografie opisanych kształtów, jakie przyjmują kryształy. Podano również uśrednione wartości długości i szerokości, których zakres wartości minimalnych i maksymalnych (tab. 3) był znaczący.

Tabela. 2. Pomiarów dwóch głównych typów kryształów: a) uśrednione wyniki ($n=30$) związane z wydłużonymi, wąskimi kształtami; b) wartości średnie ($n=30$) odnoszące się do kryształów o charakterystycznej heksagonalnej formie.

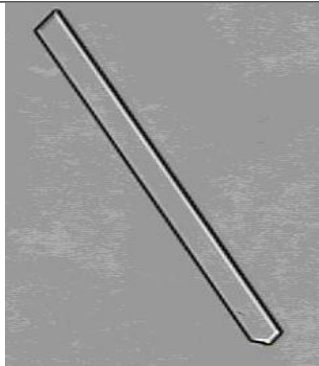
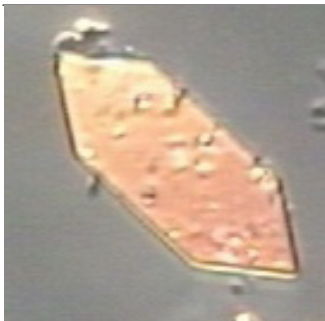
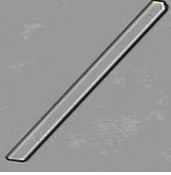
kształt kryształu	średnia długość [μm]	średnia szerokość [μm]	stosunek długości do szerokości
	177,8	12,55	14:1
kształt kryształu	średnia długość [μm]	średnia szerokość [μm]	stosunek długości do szerokości
	44,3	9,23	5:1

Tabela 3. Wartości min., max. i SD pomiarów kryształów z plechy *Ulva* (n= 30).

kształt kryształu	długość [μm]			szerokość [μm]		
	Min.	Max.	SD	Min.	Max.	SD
	105,0	248,23	101,3	6,0	16,6	7,5
	14,0	55,3	29,2	4,8	12,5	5,4

5. DYSKUSJA

Parametry fizyczno – chemiczne wód stanowisk słodkowodnych form *Ulva* wskazują na charakter eutroficzny badanych ekosystemów. Duża zawartość pierwiastków biogennych w wodzie sprzyja intensywnemu rozwojowi zielenic, w tym także gatunków z rodzaju *Ulva*. Stężenie rozpuszczonych soli w wodzie wpływa zasadniczo na przewodnictwo elektrolityczne. Tym samym wysokie wartości przewodnictwa elektrolitycznego wskazują na stan wysokiej eutrofii wody [Dojlido, 1977]. Wartość pH wody, która wynosiła w większości stanowisk $>7,0$ wskazuje na obecność w stawie węgla pod postacią HCO_3^- , który bierze również udział w procesie krystalizacji [Viera i Necchi, 2006].

Dzięki zastosowaniu XRF i ICP wykazano, iż w komórkach zielenicy i na jej powierzchni, występowała bardzo duża koncentracje jonów wapniowych. Duże stężenie wapnia w plechse ściśle związane jest z występowaniem procesu inkrustacji. Komórki plechy pobierają dwuwartościowe jony wapnia z wody, zjawisko to może przyczyniać się do powstania ogromnej różnicy w stężeniu tego pierwiastka w glonie i otaczającej go wodzie.

W pracy laboratoryjnej zastosowano różne procedury zmierzające do określenia rzeczywistej świeżej masy oraz udziału kryształów węglanu wapnia w biomase *Ulva*. Metody poddano częściowej modyfikacji, aby uzyskać wyniki obarczone jak najmniejszym błędem i w stosunkowo krótkim czasie. Analizę zawartości poszczególnych składników świeżej masy słodkowodnej zielenicy przeprowadzono na podstawie obowiązujących Polskich Norm. Pracę rozpoczęto od oznaczenia suchej masy, następnie usunięto materię organiczną

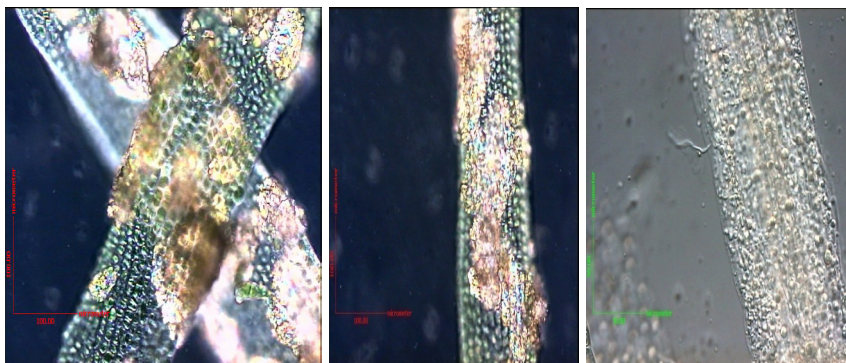
przy zastosowaniu odczynników chemicznych, a na końcu rozpuszczono kryształy wapniowe kwasem chlorowodorowym. Podczas przeprowadzania pierwszej części eksperymentu wprowadzono dwie zmiany: skrócono czas termicznej obróbki z 2 godzin do 1 godziny i podwyższono temperaturę z 105°C do 200°C. Wykorzystano w tym celu tak zwaną metodę wagową opisaną w PN-75/C-04616-01 dla określenia zawartości wody w osadach. Oznaczenie zawartości wody polega na wysuszeniu określonej porcji substratu, w tym przypadku plechy, do stałej masy w suszarce, w temperaturze 105°C w czasie 1 godziny i zważeniu suchej pozostałości. Wilgotność oblicza się z różnicy mas próby świeżej i wysuszonej, zawartość wody wyraża się w %. Podana technika jest bardzo popularna ze względu na prostotę działania i wysoką efektywność. Na tej podstawie swoje badania nad mikroflorą w Zatoce Gdańskiej oparli Haroon i inni w 1999 roku w celu określenia suchej zawartości glona i procentowej ilości wody. Kolejnym etapem, który wykonano było usunięcie całej materii organicznej, aby określić masę okrzemek i nieorganicznych związków. W tym celu użyto silnego utleniacza jakim jest nadtlenek wodoru. Jedną z stosowanych metod oczyszczania okrzemek, podaną zgodnie z normą PN-EN 13946:2006 jest reakcja w podwyższonej temperaturze $90^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ z 20 ml nadtlenu wodoru w łaźni wodnej w czasie około 3 godzin. Z obserwacji wcześniej prowadzonych podobnych doświadczeń podczas przygotowywania próbek plech *Ulva* do analizy okrzemkowej, stwierdzono, że metoda preparacji próbek z użyciem łaźni wodnej nie sprawdziła się. Próby ogrzewano nie dwie godziny, ale dwie doby, woda z łaźni wodnej w szybkim tempie wyparowywała, dlatego konieczna była częsta kontrola poziomu wody. Dlatego podczas prowadzenia badań, do próbek dodano 11 ml nadtlenu wodoru i umieszczono je w cylindrach, do których dolano wody destylowanej – stworzono warunki podobne jak w łaźni, a następnie tak przygotowany materiał umieszczono w cieplarni w temperaturze 95°C na okres 9 godzin. W ten sposób przyspieszono proces wytrawiania, a uzyskany efekt końcowy był zgodny z oczekiwanym.

Poza okrzemkami w próbówce znajdowały się jeszcze związki węgla, aby je wyeliminować dodano kwasu chlorowodorowego. Według obowiązujących norm wystarczy dodać kilka kropli, aby całkowicie rozpuścić węglany. W badanej próbce obserwowano duże stężenie związków węgla, dlatego dodano 5 ml rozcieńczonego kwasu solnego. Następnie zgodnie z zaleceniem próby odwirowano trzykrotnie w celu uzyskania oczyszczonego materiału okrzemkowego. Na koniec analizowane próby ponownie poddano procesowi suszenia, do uzyskania stałej wagi.

W analizie prowadzonej przez Coaletta i innych badaczy (2001) w celu odwapnienia gatunku ramienicy *Chara globularis* zastosowano 5%

etylenodiaminy tetraoctanu sodu przy pH 8 i następnie w temperaturze 5°C przez 48 godzin przemywano trzykrotnie wodą destylowaną, a na końcu odwirowano i suszono w 20°C. Metoda ta dała jednak mniej efektywny rezultat, gdyż próba była niecałkowicie oczyszczona. Natomiast inni badacze [Pentecost i in., 2006] w celu oczyszczenia gatunków *Chara* z inkrustacji węglanowej stosowali 0,01 M HCl w 20°C przez 3 godziny, następnie dwukrotnie próby przepłukali wodą destylowaną, po czym materiał poddali procesowi suszenia.

W celu sprawdzenia efektywności użytego rozpuszczalnika – kwasu solnego przeprowadzono krótkie doświadczenie. Polegało ono na zalaniu małej ilości plech zielenic wodą destylowaną, alkoholem etylowym i kwasem chlorowodorowym. Po upływie godziny plechy poddano obserwacji pod mikroskopem świetlnym (typu Axioskop 2 MOT firmy Zeiss). Zarówno pod wpływem wody (fot. 5a) jak i 98,8% etanolu (fot. 5b) nie zauważono żadnych zmian na powierzchni plechy, natomiast po dodaniu rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego (fot. 5c) wszystkie kryształy uległy rozpuszczeniu.



Fot. 5. Efekt zastosowania różnych odczynników do usunięcia węglanu wapnia z powierzchni plech makrozielenicy: a) z dodatkiem wody destylowanej; b) przy udziale alkoholu etylowego; c) po zastosowaniu rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego (kwiecień 2010, fot. M. Pikoosz).

Analiza kryształów

W procesie rozwoju biologicznego *Ulva* w miarę upływu czasu starzejąca się plecha staje się szorstka, mocno pokarbowana oraz stopniowo przybiera kształt coraz to silniej poskręcanych taśm. Występowanie takiej reakcji na powierzchni plech oraz ich struktury jest odzwierciedleniem realizowanego cyklu ontogenetycznego osobnika, jak i wynika z wpływu szeregu czynników. Najważniejszym z nich jest występowanie wytrącania się na powierzchni plech

inkrustacji węglanu wapnia. Ze względu na czas konieczny do wytrącenia kryształów węglanowych, proces ten nie zachodzi lub w niewielkim stopniu zachodzi na komórkach młodych osobników *Ulva*. Na młodych plechach spotykano jedynie pojedyncze, małe inkrusty. Badane zielenice w pierwszych fazach rozwoju, gdy na plechach nie zalegają masowo kryształy, mogą bez ograniczeń rozwijać się i przybierać na biomasie. Powierzchnia, na której nie zdążyły wytrącić się inkrusty jest gładka w dotyku a komórki mają nieograniczony kontakt z wodą i światłem. Młode osobniki przyjmują odcień jasnej zieleni, ponieważ bez ograniczeń związanych z obecnością inkrustów, które rozpraszają światło słoneczne lub zupełnie blokują jego przejście do komórek; mogą wykorzystywać energię świetlną. Nanokryształy wraz z upływem czasu, przy sprzyjających warunkach, mogą osiągać większe rozmiary. Występujące w znacznej mierze na powierzchni dojrzałej plechy *Ulva* kryształy odpowiedzialne są za pojawienie się nowej cechy diagnostycznej - jaką jest szorstkość plech. Jeżeli kryształy węglanu wapnia występują pojedynczo na powierzchni komórek glona (monokryształy) to nie wywierają znaczącego wpływu na właściwości fizyczne plechy. Natomiast jeżeli składają się z wielu losowo ułożonych kryształów, tworzących zespoły (polikryształy) są wtedy w znacznym stopniu odpowiedzialne za szorstkość plechy. Zjawisko inkrustacji wpływa bezpośrednio na długość i szerokość plechy. Młode osobniki, w dużej mierze wolne od wytrąconego węglanu wapnia, są dłuższe i węższe od dojrzałych plech, u których proces krystalizacji zachodzi bardzo szybko i intensywnie.

Dokładniejszą ocenę budowy inkrustów pokrywających plechy glonów wodnych uzyskać można na podstawie analizy świeżego materiału badawczego. Wiele czynników wpływa na zmiany morfologii kryształów. Wraz ze wzrostem temperatury pojawiają się mniejsze kryształy, ponieważ pod wpływem wysokich temperatur węglan wapnia ulega rozpuszczeniu. Na zmiany rozmiaru i kształtów wytrąconych kryształów mają również znaczący wpływ procesy wtórne. Czynniki powodujące rekrytalizację, agregację czy wręcz rozpuszczenie kryształów.

Obserwacje mikroskopowe potwierdziły obecność kryształów w kształcie dwóch tetraedrów połączonych podstawami oraz w kształcie ostrosłupa, u którego na przeciwległych dłuższych końcach do podstawy przylegają czworosciany. Takie formy przyjmują kryształy występujące na powierzchni plech ramienic i innych wodnych roślin naczyniowych. Dzięki powyższej obserwacji potwierdzono występowanie zjawiska zewnątrzkomórkowego wytrącania węglanu wapnia na plechach gatunków z rodzaju *Ulva*. Nie sprawdzono natomiast czy zielenice z rodzaju *Ulva* potrafią przeprowadzać jeszcze inne mechanizmy wytrącania kryształów. Jeżeli postać dorosła plechy

przypomina poskręcane taśmy, to w miejscach skręceń brak jest powierzchni do osadzania kryształów na zewnątrz. Stąd też należy wziąć pod uwagę możliwość występowania w tych obszarach wewnątrzkomórkowego procesu strącania węglanów. Proces ten u słodkowodnych form *Ulva* może przebiegać w podobny sposób jaki został opisany przez Dodsona (1974). Autor podał, że do plechy docierają jony HCO_3^- z wody, a do wnętrza wydzielane są z kolei jony CO_3^{2-} , które łącząc się z obecnymi w wodzie jonami wapnia tworzą w postaci igieł nierozpuszczalny związek wapnia. Przypuszczenie takie powstało ze względu na obecność długich, cienkich kryształów (fot. 4) obserwowanych dopiero po strawieniu komórek makroglona przy użyciu perhydrolu. Inną przyczyną występowania tego typu kryształów na powierzchni plechy mogą być przemiany polimorficzne, które zachodzą pod wpływem zmian warunków fizyczno – chemicznych. Na podstawie budowy morfologicznej kryształów można jedynie przypuszczać jaką odmianę polimorfizmu węglanu wapnia prezentują dane kryształy. Dlatego monokryształy tworzące zespoły na powierzchni plechy określono jako kalcyt, natomiast kryształy w kształcie igieł, które powstały w procesie rekrystalizacji bądź też w procesie wewnątrzkomórkowego wytrącania określono jako aragonit. W celu określenia dokładnej struktury i czystości krystalicznej węglanu wapnia należałoby zastosować dyfrakcyjną analizę rentgenowską, a do opisu odmiany polimorfizmu należy w dalszych badaniach użyć dyfraktometru proszkowego.

Badania realizowano w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr N N304 0134 37) pt. „Weryfikacja genetyczna i siedliskowa gatunków z rodzaju *Ulva* na terenie Polski”.

Badania częściowo finansowano w ramach działania 8.2 PO KL współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

6. LITERATURA

1. Barnes D. J., Chalker B. E., 1990 – *Calcification and photosynthesis in reef-building corals and algae* – Coral Reefs, Ekosystem of the World 25, Elsevier, 109-131
2. Bielański A., 2007 - *Podstawy chemii nieorganicznej* - Tom 2. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa
3. Blomster J., Maggs C. A., Stanhope M., 1998 - *Molecular and morphological analysis of *Enteromorpha intestinalis* and *E. compressa* (Chlorophyta) in the British Isles* - Journal of Phycology, 2: 319
4. Blomster J., Hoey E. M., Maggs C. A., Stanhope M. J., 2000 -

- Species – specific oligonucleotide probes for macroalgae: molecular discrimination of two marine fouling species of Enteromorpha (Ulvophyceae)* - Molecular Ecology, 2: 177
5. Blomster J., Backs S., Fewer D. P., Kirikki M., Lehvo A., Maggs C. A., Stanhope M. J., 2002 - *Novel morphology in Enteromorpha (Ulvophyceae) forming green tides* - American Journal of Botany, 89: 1756 – 1763
 6. Borowitzka M. A., 1982 - *Morphological and cytological aspects of algal calcification* - International Review of Cytology, 74: 127-162
 7. Brownlee C., Taylor A. R., 2002 - *Algal Calcification and Silification* - Encyclopedia of life sciences, 1 - 6
 8. Coat G., Dion P., Noailles M., Reviers B., Fontaine J. M., Berger – Perrot Y., Loiseaux – de Goër S., 1998 - *Ulva americana (Ulvales, Chlorophyta) from the coasts of Brittany (France). II. Nuclear rDNA ITS sequence analysis* - Eur. J. Phycol., 33: 81–86
 9. Coletta P., Pentecost A., Spiro B., 2001 – *Stable isotopes in charophyte incrustation: relationships with climate and water chemistry* – Palaeogeogr., Palaeoclim., Palaeoecol., 173: 9 - 19
 10. Crystal Structure Gallery, 2002 - <http://staff.aist.go.jp/nomurak/common/STRUCIMAGES/CaCO3-Aragonite.gif>
 11. Dauby P., Poulíček M., 1995 – *Methods for removing epiphytes from seagrasses: SEM observations on treated leaves* – Aquatic Botany, 52: 217-228
 12. Dickinson S. R., Henderson G. E., McGrah K.M., 2002- *Controlling the kinetic versus thermodynamic crystallization of calcium carbonate* - J. Cryst. Growth, 244: 369– 378
 13. Dodson J., 1974 - *Calcium Carbonate Formation by Enteromorpha nana Algae in a Hypersaline Volcanic Crater Lake* – Hydrobiologia, 44: 247-255
 14. Dojlido J., 1977 – *Chemia wód powierzchniowych* – Wyd. Ekonomia i Środowisko. Białystok: 378
 15. Encyclopedia Britannica Online, 2010 - www.britannica.com/EBchecked/topic/88899/calcite
 16. Feng B., Young A. K., An H., 2007 - *Effect of various factors on the particle size of calcium carbonate formed in a precipitation process* - Materials Science and Engineering A., 445–446: 170-179
 17. Glynn P.D., Readron E.J., 1990 - *Solid- solution equilibria: thermodynamic theory and representation* - Amer.J.Sci., 290: 164-201
 18. Hadiko G., Han Y. S. i in., 2005 - *Synthesis of hallow calcium carbonate*

- particles by the bubble templating method* - Materials Letters, 59: 2519 – 2522
19. Haroon M. A., Szaniewska A., Pliński M., 1999 - *The distribution species composition and abundance of Enteromorpha spp. in the Gulf of Gdańska* - Oceanological Studies, 28 (1 – 2): 31-39
 20. Hayden H. S., Blomster J., Maggs C. A., Silva P. C., Stanhope M., Waaland R., 2003 - *Linnaeus was right all along: Ulva and Enteromorpha are not distinct genera* - Eur J. Phycol., 38: 277–294
 21. Hayden H. S., Waaland J. R., 2002 - *Phylogenetic systematic of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences* - J. Phycol., 38: 1200–1212
 22. Hutchinson G.E., 1975 - *A treatise on Limnology* - Limnological Botany, Wiley, 3: 660
 23. Kirchoff A., Pflugmcher S., 2002 - *Comparison of the detoxication capacity of limnic and Marine form of the Green alga Enteromorpha compressa* - Marine Environment Research, 1-5: 2-73
 24. Kondracki J., 2000 - *Geografia regionalna Polski* - Wyd. Nauk. PWN, Warszawa
 25. Królikowska J., 1997 - *Eutrophication process in a shallow, macrophyte-dominated lake- species differentiation, biomass and the distribution of submerged macrophytes in Lake Łuknajno (Poland)* - Hydrobiologia 342/343, 411 - 416
 26. Larsoon C., Lennart A., Ryberg H., Beer S., 1997 – *Photosynthetic carbon utilization by Enteromorpha intestinalis (Chlorophyta) from a Swedish rockpool* – Eur. J. Phycol., 32: 49 – 54
 27. Mapa Polski, 2010 – <http://www.planmiasta.info/plan-miasta/tulce-28041.html>
 28. McConnaughey T. A., 1997 - *Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake* - Earth – Science Reviews, 42: 95–117
 29. McConnaughey T. A., 1994 - *Calcification, photosynthesis, and global carbon cycles* -Bull. de l’Institut Océanographique Monaco, no special, 13: 137– 161
 30. McConnaughey T. A., Falk R. H., 1991 - *Calcium – proton exchange during algal calcification* - Biol. Bull., 180: 185 – 195
 31. Messyasz B., Rybak A., 2008 - *Macroalga Ulva intestinalis (L.) appearing in freshwater ecosystems of Poland: a new locality in Wielkopolska* –Teka Ochrony i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego, Tom 2, 30-36
 32. Messyasz B., Rybak A., 2009 – *The distribution o green algae species*

- from the Ulva genera (syn. Enteromorpha; Chlorophyta) in Polish inland waters*– Oceanological and Hydrobiological Studies, 38 (1): 121- 138
33. Messyasz B., Rybak A., 2009a – *Preliminary morphometric and habitat characteristic of green alga Ulva prolifera (Chlorophyta, Ulvophyceae) at freshwater site in the Wielkopolska Region* – Chrońmy Przyrodę Ojczystą, 65 (5): 347 - 352
 34. Messyasz B., Rybak A., Jułga M., 2009b - *Settlement of Ulva prolifera (O.F.Müller) J. Agardh thalli by epiphytic diatoms* - In: Algal biodiversity in ecosystem of protected areas. 28th International Phycological Conference, Szczecin- Cieszno Drawskie, 21- 24th May 2009: 87-88
 35. Miyata M., Okazaki M., Furuya K., 1977 - *Site and nature of calcium carbonate deposits on a calcareous Brown alga Padina japonica* - (Studies on the calcium carbonate deposition of algae). Bull. Jap. Soc. Phycol., 25:1-6
 36. Mullin J. W., 2004 – *Crystalization* - Fourth Edition. Oxford. Butterworth – Heinemann
 37. Okazaki M., Pentecost A., Tanaka Y., Miyata M., 1986 - *A study of calcium carbonate deposition In the genus Padina (Phaeophyceae, Dictyotales)* - Br. Phycol. J., 21: 217-224
 38. Paasche E., 1964 – *A tracer of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid Coccolithus huxeyi* – Physiologia Plantarum, Supplement III: 1 - 82
 39. Pelechaty M., 2004 - *Siedliskotwórcza rola ramienic a ich wartość bioindykacyjna* W: Zaslugi prof. dr hab. Izabeli Dąbskiej w kształtowaniu dzisiejszego wizerunku ochrony przyrody – Sesja Naukowa w 20 rocznicę śmierci prof. dr hab. Izabeli Dąbskiej (1927 – 1984), Poznań: 147-159
 40. Pentecost A., 1984 – *The growth of Chara globularis and its relationship to calcium carbonate deposition in Malham Tarn* – Field Studies, 6: 53 – 58
 41. Pentecost A., Andrews J. E., Dennis P. F., Marca-Bell A., Dennis S., 2006 – *Charophyte growth in small temperate water bodies: Extreme isotopic disequilibrium and implications for the palaeoecology of shallow marl lakes* – Palaeoeco., Palaeoclim., Palaeoecol., 240: 389 – 404
 42. Pliński M., 1988 – *Głony Zatoki Gdańskiej – klucz do oznaczania gatunków*, cz. VI Zielenice, Wyd. Uniw. Gdańsk, 23 - 25

43. Pułyk M., Buczyńska E., 1997 - *Stan czystości wód powierzchniowych w zlewni rzeki Kopli na podstawie badań monitoringowych* - Wydawnictwo Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Poznaniu
44. Ray S., Klenell M., Choo K-S., Pedersén M., Snoeijls P., 2003 – *Carbon acquisition mechanisms in Chara tomentosa* – Aquatic Botany, 76: 141 - 154
45. Rybak A., Messyasz B., 2009 - *Występowanie makroglonów z rodzaju Ulva (Ulvaceae; Chlorophyta) w Wielkopolsce* - Badania Fizjograficzne nad Polską Zachodnią, Seria B – Botanika, 58: 127-136
46. Rybak A., Messyasz B., 2009a - *Ulva prolifera development in relation to environment factors of freshwater site in Tulce pond* - In: Algal biodiversity in ecosystem of protected areas. 28th International Phycological Conference, Szczecin- Cieszno Drawskie, 21- 24th May 2009: 44
47. Rybak A., Messyasz B., 2009b – *Makroglony z rodzaju Ulva sp. (Ulvaceae, Chlorophyta) jako potencjalna baza pokarmowa dla Lymnaea Stagnalis i Planorbis Corneus (Mollusca: Orthogastropoda)* - XXI Zjazd Hydrobiologów Polskich, Lublin, Polska 9 – 12 Wrzesień 2009
48. Siong K., Asaeda T., 2009 - *Calcite encrustation in macro- algae Chara and implication to the formation of carbonate – bound cadmium* - Journal of Hazardous Materials, 167: 1237-1241
49. Siong K., Asaeda T., 2009a – *Effect of magnesium on charophytes calcification: implications for phosphorus speciation stored in biomass and sediment in Myall Lake (Australia)* – Hydrobiologia, 632: 247 - 259
50. Sonntag H., 1982 – *Koloidy* - Państwowe Wyd. Nauk., Warszawa
51. Starmach K., 1963 – *Rośliny słodkowodne. Wstęp ogólny i zarys metod badań* - Flora słodkowodna Polski, Tom 1, PWN, Warszawa, 5-270
52. Starmach K., 1972 – *Zielenice nitkowate* - Flora słodkowodna Polski, PWN, Warszawa – Kraków, 158
53. Suzuki A., 1998 – *Combinated effects of photosynthesis and calcification on the partial pressure of carbon dioxide in seawater* – Journal of Oceanography, 54: 1-7
54. Tan H. I., Blomster J., Hansen G., Leskinen E., Maggs C. A., Mann D. G., Sluiman H. J., Stanhope M. J., 1999 - *Molecular Phylogenetic Evidence for a Reversible Morphogenetic Switch Controlling the Gross Morphology of Two Common Genera of Green Seaweeds, Ulva and Enteromorpha* - Mol. Biol. Evol., 16 (8): 1011-1018
55. Viera Jr. J., Necchi Jr. O., 2006 – *Photosynthetic characteristics of a*

- tropical population of Nitella cernura (Characeae, Chlorophyta)* –
Braz. J. Plant Physiol., 18 (3): 379 - 388
56. Załącznik do Uchwały Rady Gminy Kleszczewo (Nr XX/138/2008 z dnia 09 czerwca 2008 r.), 2008 - *Plan odnowy miejscowości Tulce – Gmina Kleszczewo*
57. Załącznik do Uchwały Rady Miejskiej Kórnika (z dnia 27 kwietnia 2005 r.), 2005 - *Program Ochrony Środowiska dla gminy Kórnik*