

AGATA ZEMLEDUCH, BARBARA TOMASZEWSKA

*Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Zakład Biochemii  
Umultowska 89, 61-614 Poznań  
E-mail: a.zeml@amu.edu.pl  
btomas@amu.edu.pl*

## MECHANIZMY, PROCESY I ODDZIAŁYWANIA W FITOREMEDIACJI

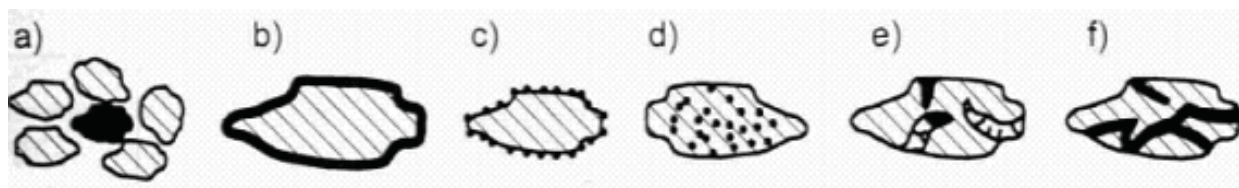
### BIODOSTĘPNOŚĆ ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH W ŚRODOWISKU

Bez względu na medium, którego dotychczas przeprowadzane zabiegi fitoremediacyjne – do zajścia jakichkolwiek procesów, konieczny jest podstawowy warunek kontaktu i oddziaływania zanieczyszczeń z “systemem roślinnym”. Na dystrybucję i los związków organicznych w poszczególnych przedziałach ekosystemów (wodzie, glebie czy organizmach żywych) oraz na ich biodostępność wpływa wiele czynników związanych z właściwościami fizyko-chemicznymi substancji i medium, w którym się ona znajduje, warunkami środowiska i aktywnością biologiczną roślin oraz niższych organizmów.

W powietrzu zanieczyszczenia mogą występować w postaci gazowej (i przemieszczać się na zasadzie dyfuzji) albo jako kropelki, drobiny pyłowe lub są z nimi związane. Częstki dymów, sadzy itp. zawierają często wiele związków chemicznych. Zarówno gazy jak i te substancje mogą być włączane w krople deszczu i sprowadzane w ten sposób na ziemię (WALKER i współaut. 2002).

Gleby tworzą złożone zależności pomiędzy żywymi organizmami, cząsteczkami mineralnymi i materią organiczną. Rozmiary jej poszczególnych frakcji mieszczą się w przedziale 0,005  $\mu\text{m}$  – 2 mm (przez agregaty koloidalne, glinę, po piasek gruboziarnisty). Ważną częścią gleby są organiczne substancje humusowe, polimery o bardzo złożonej budowie chemicznej, pochodne przetworzonej ligniny. Małe wymiary ich koloidów sprawiają, że posiadają one dużą powierzchnię

na jednostkę objętości, a różnorodność chemicznych grup czynnych w humusie sprzyja wiązaniu zanieczyszczeń przez jego składniki. Kiedy związki organiczne dostają się do gleby, zostają rozprowadzone między powierzchnią jej cząstek, wodą glebową i obecnym tam powietrzem (Ryc. 1). Istota tych działań to takie zjawiska jak: wymiana jonowa, adsorpcja, wiązania wodorowe, przechodzenie do roztworu, parowanie itp., uzależnione od wspomnianych wcześniej właściwości zanieczyszczeń (RÓŻAŃSKI 1998). Między dwoma ostatnimi z wymienionych przedziałów gleby (wodą i powietrzem) istnieje równowaga dynamiczna, im więcej porów wypełnia woda, tym gleba jest słabiej natleniona, i odwrotnie. Związki o wysokim ciśnieniu pary przechodzą do powietrza zawartego w jej przestworach, gdzie mogą pozostać jakiś czas, po czym ulatniają się do atmosfery. Związki hydrofilowe, o niskich wartościach  $K_{ow}$ , w niewielkim stopniu wiążą się na koloidach gleby (z tzw. wodą higroskopijną), przemieszczają się swobodnie wraz z wodą kapilarną (pozostającą w porach), są łatwo dostępne dla organizmów glebowych, ale mogą też być pod wpływem siły ciężkości przenoszone w głąb jej profilu (wraz z wodą grawitacyjną, pochodzącą z opadów) (RÓŻAŃSKI 1998, KOPCEWICZ 2002, WALKER i współaut. 2002). Stosunek ilościowy tych dwóch ostatnich rodzajów wody glebowej zależy od typu podłoża, wielkości i rozmieszczenia przestworów (te o średnicy około 10  $\mu\text{m}$  zatrzymują wodę, a  $> 60 \mu\text{m}$  po-



Ryc. 1. Zanieczyszczenia występujące w glebie: a) cząstki o wielkości zbliżonej, większej lub mniejszej od cząstek gruntu, b) błonki otaczające cząstki gruntu, c) zaadsorbowane na cząstkach gruntu, d) absorbowane w cząstkach gruntu, e) rozpuszczone w wodzie w porach gruntu, f) stałe lub ciekłe w porach gruntu.

zwalają jej się szybko przemieszczać) (RÓŻAŃSKI 1998). Ciecze niewodne też mogą przeciekać do wody gruntowej, a to czy opadną na dno, czy utrzymają się na jej powierzchni przewiduje się na podstawie ich gęstości (PILON-SMITS 2005). Z kolei, związki hydrofobowe ( $K_{ow} > 3$ ) najczęściej ulegają silnemu związaniu do glebowej materii organicznej, co ogranicza ich mobilność i biodostępność, efekt ten potęguje się z czasem, szczególnie wobec naturalnych cykli zalewania i osuszenia ziemi (LUNNEY i współaut. 2004). Substancje lipofilne mają więc zazwyczaj długie okresy półtrwania, ponieważ trwałe przyłączenie do cząstek gliny lub humusu utrudnia ich eliminację na jakiegokolwiek drodze. Oporności na transformację sprzyja też niska temperatura.

W ekosystemach wodnych, nietrwale (łatwo ulegające np. hydrolizie) i lotne zanieczyszczenia organiczne stwarzają niewiele problemów, chyba że produkty ich przemian okażą się toksyczne. Związki rozpuszczalne mają tendencję do rozprzestrzeniania się po całej powierzchni wody. Lipofilne natomiast głównie wiążą się z cząsteczkami osadów dennych, utworzonych, podobnie jak gleby, z materii organicznej, nieorganicznej oraz organizmów żywych. Pobieranie i przemiany takich substancji będą zależały między innymi od zawartości tlenu, potencjału redox i tym podobnych, rozważanych już wcześniej czynników (WALKER i współaut. 2002).

Na los zanieczyszczeń organicznych i ich biodostępność dla roślin, może wpływać, oprócz właściwości fizykochemicznych ich samych i otoczenia, aktywność życiowa współwystępujących organizmów. Przede wszystkim drobnoustrojów, gdyż wiele z mikroorganizmów autochtonicznych ma zdolność mineralizowania, częściowej transformacji lub kometabolizmu zanieczyszczeń. Ich naturalną cechą jest przetwarzanie zawartych w glebie

substancji organicznych, w celu pozyskania energii, węgla, azotu, elektronów. Efektem ich działalności może być zmniejszenie stężenia związków niebezpiecznych, np. przez ich przekształcanie do form nietoksycznych, modyfikowanie kowalencyjnego przyłączenia do cząstek gleby [inkorporacja/zużycie węgla z tzw. pozostałości związanej (ang. bound residue)], zmiana właściwości fizyko-chemicznych zanieczyszczenia lub medium, co może wpłynąć na rozpuszczalność w wodzie czy osłabienie wiązania z humusem itp. Organizmy inne niż bakterie także mogą modulować biodostępność zanieczyszczeń organicznych dla roślin. Wykazano pozytywną korelację między obecnością w glebie dżdżownic z gatunków *Lumbricus terrestris* i *Eisenia foetida* a pobieraniem p,p'-DDE (ang. p,p'-dichlorodifenyldichloroetylen) przez dynie *Cucurbita pepo* i *C. maxima* (KELSEY i WHITE 2005). Wyniki przeprowadzonego badania przypisano pozytywnemu wpływowi, jaki pierścienice wywierały między innymi na strukturę gleby. Same rośliny również mogą zwiększyć biodostępność apolarnych związków organicznych (takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne WWA, chlordan, p,p'-DDE itp.), poprzez wydzielanie różnego rodzaju surfaktantów (saponiny, lecytyny), a także eksudatów korzeniowych, jak u rodzaju *Cucurbita* i *Cucumis*. Ważnym ich składnikiem są niskocząsteczkowe kwasy organiczne (bursztynowy, malonowy, jabłkowy, winowy itp.), które chelatując określone metale, zaburzają strukturę gleby i pozwalają na uwolnienie zanieczyszczeń związanych z humusem (WHITE i współaut. 2003, FAVA i współaut. 2004, LUNNEY i współaut. 2004, WANG i współaut. 2004b). Rośliny mogą wpływać wielorako na labilność związków w podłożu, także negatywnie, np. zwiększając ilość miejsc, w organicznej frakcji matryks gleby, do których cząstki zanieczyszczeń mogą się adsorbować (PARRISH i współaut. 2005).

## FITOREMEDIACJA IN PLANTA

POBIERANIE, TRANSPORT I AKUMULACJA  
ZANIECZYSZCZEŃ W ROŚLINIE

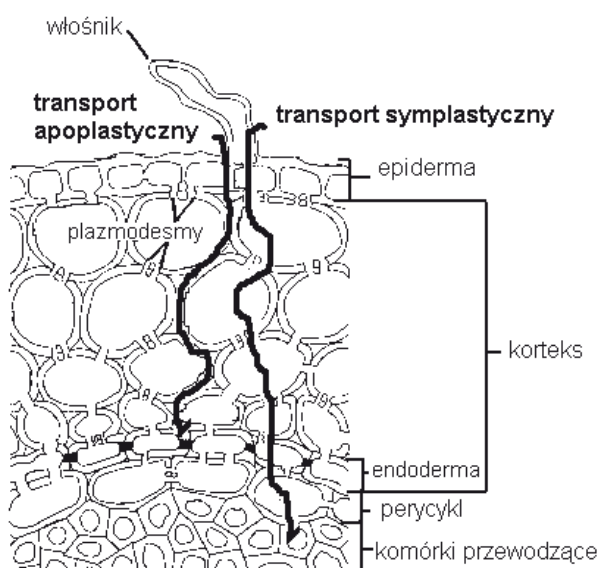
Ogólny model przedstawiający losy zanieczyszczeń organicznych w obrębie organizmu roślinnego obejmuje zagadnienia związane z ich pobieraniem, przemieszczaniem, interakcjami, transformacjami biologicznymi, magazynowaniem i ewentualnie usuwaniem. Każde z nich jest bardzo istotne w przewidywaniu efektywności fitoremediacji, niezależnie od stosowanej metody.

Główne drogi, jakimi zanieczyszczenia dostają się do rośliny, prowadzą przez korzenie oraz liście. Rośliny naczyniowe kontaktują się z podłożem za pośrednictwem systemu korzeniowego; tą drogą czerpią wodę i substancje mineralne, potrzebne do życia. Zostają one potem, w postaci roztworu, układem naczyń przewodzących, rozprowadzone do wszystkich innych organów. Biodostępne zanieczyszczenia organiczne, obecne w ryzosferze, mogą być pobierane w formie gazowej lub rozpuszczonej, a ze względu na swoje, najczęściej antropogeniczne pochodzenie, nie mają w roślinach specyficznych transporterów błonowych. Jest to więc proces pasywny – dyfuzja (KIM i współaut. 2004). Wyjątkiem mogą być jedynie związki przypominające hormony roślinne (np. herbicydy fenoksykwasowe), które bywają pobierane aktywnie (COLLINS i współaut. 2006). Dyfuzja prosta, jako sposób przemieszczania się zanieczyszczeń ze środowiska do wnętrza rośliny, zależy zarówno od jej cech oraz od struktury i właściwości związku. Czasem obserwuje się wybiórcze pobieranie jednego z izomerów, gdy różnią się one np. rozpuszczalnością w wodzie (ASAI i współaut. 2002). Związki o wartościach  $\log K_{ow}$  między 0,5 a 3 są na tyle hydrofobowe, żeby pokonać barierę dwuwarstwowej lipidowej błony i jednocześnie na tyle hydrofilowe, żeby zostać składnikiem roztworu komórkowego. Natomiast jeśli wykazują one zbyt dużą rozpuszczalność w wodzie ( $\log K_{ow} < 0,5$ ) nie mogą przejść przez błony i dostać się do rośliny. Z kolei, związki bardzo hydrofobowe ( $\log K_{ow} > 3$ ) mają tendencję do zatrzymywania się we frakcjach lipofilnych komórek epidermy korzenia. Eksperymenty dotyczące pobierania substancji niejonowych (WWA, polichlorowanych bifenyli PCB, polichlorowanych: dibenzo-p-dioksyn PCDD i dibenzofuranów PCDF) z roztworu hydroponicznego wykazują, że na proces ten składają się dwa zjawiska: równoważenie koncentracji

związku w wodnej fazie korzenia i otaczającym środowisku oraz właśnie sorpcja do błon i ścian komórkowych (PILON-SMITS 2005). To ostatnie zależy w dużym stopniu od ilościowej i jakościowej zawartości lipidów, a to z kolei jest cechą charakterystyczną gatunku. Stopień wnikania zanieczyszczeń organicznych do roślin jest opisywany przez współczynnik koncentracji w korzeniach (ang. root concentration factor, RCF), tj. stosunek stężenia związku wewnątrz korzenia i w roztworze zewnętrznym. Zależy on między innymi od wartości  $\log K_{ow}$ , wielkości cząstek (duże adsorbują się tylko na wierzchu skórki) (FISMES i współaut. 2002). Bezpośredni kontakt z dostępną fazą glebową (np. z wodą kapilarną i czasowo z grawitacyjną) mają włosniki. Występują one w strefie blisko wierzchołka wzrostu (komórki mają tam cieńsze ściany), a ich powierzchnia może być nawet kilka razy większa niż pozostałych części korzenia. Powierzchnia chłonna zaś może się jeszcze powiększyć, gdy roślina współżyje z grzybem mikoryzowym. Absorpcja odbywa się głównie siłami osmotycznymi, gdy potencjał wody w komórkach jest niższy niż roztworu zewnętrznego. Zależy też od obecności tlenu, dwutlenku węgla i temperatury (np.  $CO_2$  może zmniejszyć przepuszczalność korzeni dla wody) (KOPCEWICZ 2002, SZWEYKOWSCY 2003).

Po przeniknięciu wody do włosników, musi ona spenetrować kilka warstw komórek nim dotrze do systemu przewodzącego rośliny, a więc do ksylemu. Do granicy endodermi (przez epidermę, korę pierwotną) droga wiedzie przeważnie za pomocą dyfuzji, zgodnie z gradientem potencjału wody, dalej na powierzchni i w kapilarach ścian komórkowych, czyli apoplastem, którego system stanowi około 5% objętości korzenia (WILD i współaut. 2005b). Jest to transport około 50 razy szybszy niż symplastyczny, który wymaga wnikania do protoplastów. U różnych gatunków wykorzystywany jest on w różnym stopniu (Ryc. 2) (KOPCEWICZ 2002). Jak zaobserwowano przy pomocy metody TPME (ang. two photon excitation microscopy), na przykładzie fenantrenu i antracenu, poruszających się wewnątrz korzeni kukurydzy i pszenicy, substancje organiczne mogą się koncentrować, formując jakby "strumienie" (WILD i współaut. 2005b). W endodermie przemieszczające się związki muszą przejść przynajmniej przez jedną błonę komórkową,





Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie przekroju poprzecznego korzenia oraz dróg przemieszczania się roztworów, zaznaczono endodermę z pasmkami Caspariego; zgrubieniami na wewnętrznych stykach i na promienistych płaszczyznach ścian komórek (zmodyfikowana wg <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookPLANTHORM.html>)

gdyż ma ona w ścianach radialnych tzw. pasmka Caspariego, zawierające suberynopodobne składniki hydrofobowe, kontrolujące dopływ wody do cewek i naczyń walca osiowego (Ryc. 2). Alternatywnie mogą one przeniknąć do pericyklu przez komórki przepustowe. Związki hydrofobowe, w przeciwieństwie do hydrofilowych, nie wchodzi w skład soku ksylemu, zostając w lipofilowych miejscach (SZWEYKOWSKA 1997).

Transport roztworów w górę rośliny napędzany jest przez transpirację i parcie korzeniowe. Ważne jest w tym procesie utrzymanie słupa cieczy w ksylemie, opór grawitacyjny i tarcie. Natężenie transpiracji jest zależnie od gatunku ze względu na jego metabolizm, np. typ fotosyntezy  $C_4/C_3/CAM$  czy też anatomie, np. stosunek powierzchnia/objętość, ilość szparek, głębokość korzeni itp. Translokację zanieczyszczeń organicznych można oceniać na podstawie wartości współczynnika koncentracji w strumieniu transpiracyjnym (ang. transpiration stream concentration factor, TSCF), który jest stosunkiem stężenia związku w soku ksylemu i w roztworze zewnętrznym. Czynnikiem ten wykazuje podobną korelację z  $\log K_{ow}$  jak RCF. Substancje z wartościami

między 0,5 a 3 są najłatwiej przesyłane do górnych części rośliny, przy czym maksymalny TSCF notowano przy  $\log K_{ow}$  około 1,8 (COLLINS i współaut. 2006). Zanieczyszczenia transportowane w łądźce mogą ponadto dyfundować na boki i być zatrzymywane w komórkach sąsiadujących (szczególnie w lipofilnych miejscach) lub być w nich metabolizowane. Bierze się to z dążenia do równowagi między fazami wodnymi w organizmie rośliny, czego następstwem jest zmniejszenie stężenia związku w soku ksylemowym i wytworzenie się "siły pociągowej" do jego pasywnego pobierania z podłoża. Na ruch i dystrybucję zanieczyszczeń wzdłuż łądźki, mają wpływ: zawartość lipidów i lignin, właściwości związków, współczynnik transpiracyjny (im związek bardziej hydrofobowy tym więcej wody potrzeba do jego transportu) i lokalizacja w łądźce, bo sorpcja następuje wraz z przemieszczaniem się roztworu w górę (MA i współaut. 2004, BARBOUR i współaut. 2005, LI i współaut. 2005). Na podstawie TSCF można więc oszacować ich stężenie w częściach rośliny, do których muszą one być dostarczone (np. w owocach). Związki o niskich wartościach  $\log K_{ow}$  szybciej osiągają równomierne rozłożenie w organach (COLLINS i współaut. 2006). Innym przypadkiem zmniejszania się stężenia zanieczyszczeń wraz ze wzrostem wysokości jest ich wyparowywanie z ksylemu, np. z pnia. Temu zjawisku przypisywane są liczne obserwacje związane z fitowatylicacją perchloroetyleny PCE, czy też trichloroetyleny TCE i produktów jego degradacji, przez topole. W eksperymentach wykazano, że ważny jest tu obwód pnia na danej wysokości – przepływ soku w naczyniach dominował w warstwie do kilku centymetrów w głąb pnia i stamtąd właśnie mogła zachodzić największa dyfuzja tych lotnych związków (ang. volatile organic compounds, VOCs) do atmosfery. Ich koncentracja w obrębie pnia malała w sposób wykładniczy promieniście, w kierunku od wewnątrz (BURKEN i współaut. 2005, MA i BURKEN 2004).

W liściach wiązki przewodzące stają się coraz drobniejsze. Z ich zakończeń woda wraz z transportowanymi substancjami organicznymi przenika do komórek parenchymy i dalej do mezofilu. W komórkach miękkiszowych liścia znów wędruje głównie apoplastem, a jej większość paruje do przestworów międzykomórkowych i uchodzi do atmosfery przez kutikulę czy aparaty szparkowe. Ten etap ma znaczenie dla dobrze rozpuszczalnych w wodzie, lotnych zanieczyszczeń or-

ganicznych (VOCs), takich jak wspomniany wcześniej TCE czy MTBE (eter metylocylobutylowy), które również w taki sposób mogą ulegać fitowolatilizacji (PILON-SMITS 2005, SZWEYKOWSKA 1997).

Ksenobiotyki przenikają do roślin także w miejscach zranienia (kalus to obszar wzmożonego kumulowania np. pestycydów), czy przez liście (np. WWA), pomimo obecnej na nich warstwy ochronnej w postaci kutykuli, aktywności mikroorganizmów, zmywania przez opady atmosferyczne oraz działania promieni słonecznych itp. (RÓŻAŃSKI 1998, TAO i współaut. 2006). Główne źródło akumulacji zanieczyszczeń w liściach to właśnie absorpcja z powietrza (WILD i współaut. 2005a). Czasem mogą one także być transportowane floemem w dół rośliny. Związki organiczne przedostające się przez otwory szparkowe, czy warstwy epidermy, rozdziela się między fazę wodną i lipidową komórek liści. Badania wykazały, że dla wielu z nich rozdział między powietrze a organizm roślinny jest związane ze współczynnikiem podziału oktanol/powietrze ( $\log K_{oa}$ ). Pobieranie ich gazowej fazy zachodzi przy wartościach  $\log K_{oa} < 8,5$  (antracen, fenantren) a przy większych ( $\log K_{oa}$  9-11) jest ograniczone do deponowania cząstek stałych na powierzchni liści (benzo[a]piren) (COLLINS i współaut. 2006, WILD i współaut. 2006). Ksenobiotyki mogą więc występować w postaci gazowej, bądź jako krople, pyły itp. osadzać się z mokrymi lub suchymi cząstkami gleby. Ważna jest powierzchnia eksponowana na zanieczyszczenia; jej wielkość i charakterystyka (np. obecność włosków). Powierzchnia liści może być nawet 14 razy większa niż ziemi, nad którą roślina rośnie. Osadzone na nich cząsteczki zanieczyszczeń są usuwane, degradowane fotolitycznie albo biologicznie lub włączane do kutykuli. Ta substancja o charakterze tłuszczowym, zbudowana z alifatycznych biopolimerów: kutyny, wosków (alkoholi, kwasów, estrów, aldehydów, ketonów..), jest selektywnie przepuszczalna dla małych cząstek, stanowiąc barierę dla większych. Także lipofilność absorbowanych związków ma tutaj duże znaczenie. Grubość kutykuli bywa różna (0,1-10  $\mu\text{m}$ ) i zależy między innymi od gatunku rośliny i warunków środowiska, np. topografii liścia czy wiatru. Właśnie z powodu działania wspomnianego czynnika atmosferycznego ta powłoka ochronna jest najcieńsza na obrzeżach liści. Zanim związek organiczny przeniknie do komórek epidermy musi przejść przez 5 warstw: wosk epikutylarny, właści-

wą kutykulę, "warstwę kutykularną", pektynową i ścianę komórkową (WILD i współaut. 2004, 2005a, b, 2006). Dokładne zbadanie tego procesu, jego wizualizację i pomiar w czasie rzeczywistym, umożliwiła przytaczana wcześniej metoda TPTEM. Zobrazowano go na przykładzie przemieszczania się fenantrenu z zewnątrz do środka liści kukurydzy, *Zea mays*, i szpinaku, *Spinacia oleracea*. W ciągu 12-dniowego eksperymentu niebieską autofluorescencję związku obserwowano w wielu różnych kompartmentach liści: na powierzchni i w warstwie kutykuli, w ścianach komórkowych, cytoplazmie i wakuolach epidermy, mezofilu i ksylemu, a więc nawet w wiązkach przewodzących, tzn. na głębokości 115-135  $\mu\text{m}$  (w przypadku kukurydzy). Uwidoczniony również został odmienny sposób transportu zanieczyszczenia w tych dwóch roślinach; w szpinaku dominuje typ symplastyczny, w kukurydzy apoplastyczny (WILD i współaut. 2006).

Procesy pobierania, transportu i akumulacji zanieczyszczeń organicznych są w fitoremediacji kwestią wymagającą wnikliwej analizy dla optymalnego dostosowania metody do typu zanieczyszczenia, medium i warunków środowiska. Na te potrzeby tworzone są kolejne modele badawcze, eksperymentalne, kinetyczne, prognostyczne oraz opracowania matematyczne ilościowo opisujące te zjawiska (KIM i współaut. 2004, MA i współaut. 2004, LI i współaut. 2005, COLLINS i współaut. 2006, SU i ZHU 2006, WILD i współaut. 2006). Uzyskiwane z ich pomocą wyniki uwidaczniają zależności charakteryzujące te procesy, czyli wpływ właściwości fizyko-chemicznych zanieczyszczeń i cech wykazywanych przez badane rośliny (biomasa, typ systemu korzeniowego, skład lipidowy różnych organów, zawartość innych składników, poziom transpiracji itd.) (BARBOUR i współaut. 2005, LI i współaut. 2005). Często istnieje pozytywna korelacja między ilością zanieczyszczenia obecnego w podłożu a stopniem jego akumulacji w organizmie roślinnym (np. w przypadku WWA) (GAO i ZHU 2004). Ta zdolność gromadzenia związków chemicznych we własnych tkankach, szczególnie nadziemnych, możliwych do zebrania przez człowieka (i następnie odpowiedniej utylizacji), jest wykorzystywana w niektórych technikach fitoremediacji. Niekiedy jednak, pobieranie i translokacja zanieczyszczeń do pędów może być niebezpieczna ze względu na to, że mogą one posłużyć jako pokarm dla roślinożerców, a w ten sposób związki te

będą włączone w łańcuch pokarmowy. Niekorzystne byłoby też odkładanie ksenobiotyków w znacznym stopniu, np. w liściach drzew, które opadając przywracałyby je do obiegu i umożliwiały dalsze interakcje w środowisku. Dlatego przy wykorzystaniu roślin w remediacji często preferowane są gatunki, w miarę możliwości gromadzące związki toksyczne w częściach jak najmniej dostępnych, np. pod ziemią, lub wykazujące zdolność ich biotransformacji czy też degradacji do produktów nie stwarzających niebezpieczeństwa dla organizmów żywych.

#### LOS KSENOBIOTYKÓW W KOMÓRCE ROŚLINNEJ

##### Fitotoksyczne oddziaływania zanieczyszczeń organicznych

Negatywne efekty, jakie związek wywiera na daną roślinę, zależą od jego właściwości, aktywności chemicznej, czasu ekspozycji, dawki, drogi wnikania, jego interakcji z innymi substancjami szkodliwymi itp. Opracowano wiele metod oceny toksyczności zanieczyszczeń dla różnych gatunków roślin i ich tolerancji na obecność ksenobiotyków w otoczeniu i własnym organizmie. Określa się to porównując reakcje roślin z miejsc skażonych i "czystych", na różne stężenia substancji niebezpiecznych. Podstawowymi parametrami mogą być między innymi: przeżywalność siewek, osiągnięta biomasa, wzrost pędu i korzenia, wystąpienie chlorozy liści, plam nekrotycznych, opóźnionego kwitnienia itp. (WALKER i współaut. 2002, ALKIO i współaut. 2005). Zanieczyszczenia mogą uszkadzać organizm rośliny poprzez wpływ na przemiany biochemiczne takich procesów fizjologicznych jak; fotosynteza, oddychanie czy wzrost (lub podziały komórek). Bywają za to odpowiedzialne np. herbicydy, w tym pochodne mocznika i triazyny, zaburzające przepływ elektronów przez układy fotosyntezy (szczególnie często dotyczy to fotosystemu II), a także związki będące analogami fitohormonów (herbicydy – pochodne kw. chlorofenoksyoctowego, np. 2,4-D itp.). Obserwuje się także uszkodzenia szlaku syntezy chlorofilu i stres oksydacyjny związany z generowaniem reaktywnych form tlenu (ALKIO i współaut. 2005, MITSOU i współaut. 2006). Znane są związki genotoksyczne, których produkty przekształceń w organizmie mogą oddziaływać z DNA, czasem tworząc trwałe połączenia kowalencyjne, prowadzące niekiedy do mutacji. Zanieczyszczenia będące związkami wysoce reaktywnymi, mogą łatwo łączyć się z miejscami docelowymi

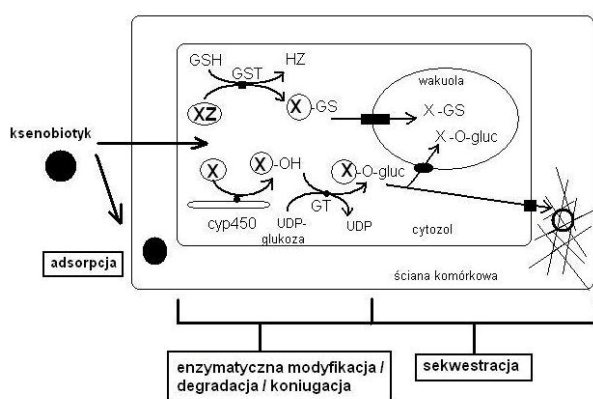
mi i w ten sposób np. inaktywować enzymy, czy też aktywować pretoksyny. Ich działanie może być selektywne w stosunku do organizmu, szlaku metabolicznego i specyficzne lub nie dla określonego typu substancji. Ogólnie, ksenobiotyki dostające się do rośliny wywołują zmiany dwojakiego rodzaju: negatywne, często prowadzące do jej zatrucia, oraz reakcje obronne. Przekraczając określony poziom w komórce, powodują indukcję syntezy i aktywację systemów enzymatycznych, zdolnych do ich metabolizowania. Dzięki temu mogą one zostać usunięte, ulec detoksykacji lub może zostać ograniczona ich biodostępność, co może zapobiegać uszkodzeniom (WALKER i współaut. 2002). Często wymaga to mobilizacji całego potencjału energetycznego komórki i znacząco zmienia jej metabolizm (WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Oprócz mechanizmów kontrolujących ilość substancji niebezpiecznych, komórka roślinna dysponuje jeszcze mechanizmami naprawczymi. Przykładem może być wytwarzanie białek stresowych czy też aktywność systemów reperacji DNA.

W minionym 15-leciu nastąpił rozwój metod, pozwalających badać zmiany, które zachodzą w komórkach roślin po kontakcie z ksenobiotykami (lub pod wpływem innych czynników stresowych; susza, zasolenie, ozon itp.), nie tylko poprzez wykrywanie aktywności poszczególnych enzymów, ale "u samego źródła", czyli na poziomie ekspresji genów. Wykorzystywane są w tym celu np. metoda SAGE (ang. serial analysis of gene expression), techniki hybrydyzacji na mikromacierzach, RT-PCR (ang. reverse transcription polymerase chain reaction) (EKMAN i współaut. 2003, ALKIO i współaut. 2005, MENTEWAB i współaut. 2005, MEZZARI i współaut. 2005). Doświadczenia tego typu przeprowadza się, między innymi po to, aby jeszcze dokładniej scharakteryzować różnice w przebiegu procesów biochemicznych w komórkach roślin poddanych stresowi wywołanemu obecnością ksenobiotyków w otoczeniu. Pozwalają one zidentyfikować specyficzne enzymy i szlaki metaboliczne, które warunkują ewentualną tolerancję na dany związek chemiczny oraz umożliwiają ocenę jego stężenia, wywołującego określone reakcje w roślinie.

##### Roślinny system detoksykacji ksenobiotyków

Rośliny wykazują aktywność unieczyniania wielu niebezpiecznych związków organicznych, występujących w środowisku. Zdolność komórki roślinnej do ochrony i





Ryc. 3. Mechanizm tolerancji zanieczyszczeń organicznych w komórce roślinnej.

Różne sekwencje przekształceń chemicznych ksenobiotyków (X) doprowadzają do wygenerowania bezpiecznych dla komórki pochodnych, które mogą być następnie zdeponowane w wakuoli lub ścianie komórkowej. Niektóre zanieczyszczenia podlegają bezpośredniej koniugacji z glutationem (GSH) przy pomocy S-transferaz glutationowych (GST), inne są wstępnie utleniane z udziałem cytochromów P450, po czym sprzęgane z cukrowcami, np. glukozą, za co odpowiada UDP-zależna glukozylotransferaza (GT). Powstałe produkty detoksykacji (X-GS, X-O-gluc) są aktywnie usuwane z cytozolu (wg KREUZA i współaut. 1996, zmodyfikowana).

obrony przed negatywnym działaniem ksenobiotyków ma znaczenie, między innymi w kontekście zjawiska odporności na herbicydy i jest najważniejszym aspektem fitoremediacji (KREUZ i współaut. 1996). Mechanizmy zabezpieczające przed działaniem toksyn działają przeciwko „naturalnym” ksenobiotykom, tzn. związkom produkowanym przez różne gatunki lub powstającym w wyniku pożarów lasów itp., zachodzących odkąd pojawiły się rośliny wyższe, jak i przeciw „nowszyemu ewolucyjnie” zanieczyszczeniom pochodzenia antropogenicznego. Ich losy w komórce roślinnej opisuje tzw. „model zielonej wątroby” (ang.

green liver concept), oparty na analogiach do systemu odtruwania, opisanego dla organizmów zwierzęcych (na poziomie metabolitów, klas enzymów i sekwencji cDNA) (SANDERMANN 1994). Włączenie ksenobiotyków w pewien cykl przemian (często przebiegający w tych samych warunkach, co „normalny” metabolizm, gdzie aktywne są takie same enzymy) pozwala na bardzo restrykcyjną dystrybucję w przedziałach organizmu/akumulację, zmniejsza biologiczny czas półtrwania cząstek toksycznych, przez co skraca czas ekspozycji rośliny na ten czynnik. Całkowita degradacja związków organicznych (mineralizacja) zachodzi rzadko, jednak produkty biotransformacji, tj. fragmenty cząsteczek macierzystych mogą być wykorzystywane np. przy syntezie aminokwasów albo sprzęgane z naturalnymi składnikami roślin (RÓŻAŃSKI 1998). W procesie detoksykacji wyróżniono kilka faz, charakteryzujących się udziałem różnych klas enzymów, przeznaczeniem i właściwościami produktów ich reakcji:

- bioaktywacja – odsłonięcie lub wygenerowanie w ksenobiotyku reaktywnych grup chemicznych, co przygotowuje związek do faktycznej detoksykacji w następnej fazie;

- koniugacja z substratem endogennym – co czyni związek mniej niebezpiecznym (zazwyczaj elektrofilowe związki zanieczyszczające stanowią zagrożenie dla nukleofilowych składników komórki) i bardziej hydrofilnym;

- kompartmentacja – zachodzi w niej usunięcie tak zainaktywowanych pochodnych z cytozolu (do wakuoli lub apoplastycznych przedziałów komórki), pozwala to na bezpieczne zdeponowanie pochodnych toksyn oraz ich ewentualny dalszy rozkład (Ryc. 3) (COLEMAN i współaut. 1997, KREUZ i współaut. 1996, KOMIVES i GULLNER 2005).

Więcej szczegółów dotyczących komórkowego systemu detoksykacji zanieczyszczeń organicznych u roślin przedstawiono w tekście ZEMLEDUCH i TOMASZEWSKIEJ (2007a).

## FITOREMEDIACJA EX PLANTA

### ROLA RYZOSFERY

Fitoremediacja może zachodzić również poza wnętrzem komórek roślin i bez pobierania przez nie zanieczyszczeń (PILON-SMITS 2005). Zjawisko to jest związane z ich korzeniami oraz najbliższym, otaczającym je medium glebowym, które pozostaje pod

wpływem organizmu roślinnego. Tak zwana ryzosfera, zdefiniowana w 1903 r. przez Hiltnera i Stornera, to dynamiczne i skomplikowane środowisko. Obejmuje obszar około 1mm wokół korzeni (kilka cm od powierzchni – jeśli rozważać strefę pobierania wody i substancji odżywczych, do kilkunastu – jeśli

brać pod uwagę zasięg lotnych związków uwalnianych przez roślinę) i stanowi strefę kompleksowych interakcji między roślinami i różnymi mikroorganizmami wszechobecnymi w glebie, a także miejsce aktywności wielu pozakomórkowych enzymów (MCCUTCHEON i SCHNOOR 2003, STOTTMEISTER i współaut. 2003, HYNES i współaut. 2004). Remediacja w ryzosferze może być procesem pasywnym (stabilizacja związków zanieczyszczających poprzez zapobieganie erozji czy kontrolę hydrauliczną, adsorpcja na powierzchni korzeni lub lignifikacja – inkorporacja lipofilnych związków w strukturę ścian komórkowych) lub aktywnym, przeprowadzanym przez rośliny i mikroorganizmy. W każdym razie, zjawiska jej towarzyszące wpływają zarówno na biodostępność, pobieranie przez rośliny jak i na degradację zanieczyszczeń organicznych (PILON-SMITS 2005).

#### Substancje wydzielane na zewnątrz komórek

Enzymy przyczyniające się do ryzodegradacji ksenobiotyków można podzielić na dwie klasy: (1) o pochodzeniu cytozolowym, których aktywność objawia się w asocjacji ze ścianami komórkowymi (ich powierzchnią) oraz (2) katalizatory celowo wydzielone do środowiska zewnętrznego, przez korzenie roślin i komórki mikroorganizmów. Większą rolę w oddziaływaniu z zanieczyszczeniami mają te drugie. Są wśród nich różne oksydoreduktazy i esterazy, które normalnie pełnią funkcje obronne (utlenianie toksycznych, rozpuszczalnych w wodzie metabolitów do nierozpuszczalnych polimerowych produktów) czy degradacji na użytek metabolizmu (hydrolitycznej, np. lignin, kwasów humusowych, fenoli). Wiele z tych enzymów charakteryzuje się znikomą specyficznością substratową, co uzdalnia je do transformacji również rozmaitych organicznych ksenobiotyków i czyni z nich wartościowy obiekt badań, w kontekście wykorzystania w remediacji. Członkowie takich rodzin, jak: Fabaceae, Graminaceae i Solanaceae mogą wydzielać

peroksydazy do medium, w którym się znajdują. Biorą one następnie udział np. w usuwaniu fenoli z roztworów wodnych (DURAN i ESPOSITO 2002, JANSEN i współaut. 2004). Innymi enzymami sekrecyjnymi są lakkazy, dehalogenazy, nitroreduktazy, czy nitrylasy (WANG i współaut. 2004a). Zewnątrzkomórkowe enzymy, pochodzące od mikroorganizmów, izolowano między innymi z degradujących drewno *Bazydio mycetes*, grzybów żyjących w ektomikoryzie, a także z glebowych *Actinomyces* i grzybów mikroskopijnych. Znane są wśród nich np. ligninolityczne lakkazy, a także różne peroksydazy (Mn-zależne, ligninowe), zdolne do degradacji takich związków chemicznych jak: fenole, aniliny, fenantren, piren, antracen itp. (GADD 2001, VAN AKEN i współaut. 2004, MEADE i D'ANGELO 2005, SONOKI i WSPÓLAUT. 2005).

Poza enzymami mogącymi modyfikować grupy chemiczne zanieczyszczeń, zwiększając ich biodostępność i możliwość degradacji przez organizmy, na los związków w glebie wpływ mają również inne substancje produkowane przez rośliny i mikroorganizmy. Niektóre bakterie uwalniają biosurfaktanty (np. ramnolipidy) zwiększające rozpuszczalność ksenobiotyków w wodzie. Podobne działanie wykazują także lipidowe składniki eksudatów wydzielanych przez korzenie licznych gatunków roślin (PILON-SMITS 2005). Związki takie, jak cukry, kwasy, alkohole itp. wydzielane do warstw gleby będących w bezpośrednim kontakcie z korzeniami (Tabela 1) mogą stanowić nawet do 35% węgla zasymilowanego w czasie rocznej fotosyntezy (RENTZ i współaut. 2005, WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Służą one między innymi zwiększaniu dostępności dla roślin składników takich, jak fosfor czy żelazo, mają działanie allelopatyczne i odgrywają ważną rolę w tzw. „efekcie ryzosferi” (STOTTMEISTER i współaut. 2003).

#### Interakcje roślin i mikroorganizmów glebowych

Rozkład przez mikroorganizmy jest głównym mechanizmem degradacji wielu zanie-

Tabela 1. Przykłady substancji znajdujących się w eksudatach i ekstraktach korzeniowych.

węglowodany	glukoza, ksyloza, mannitol, maltoza, oligocukry
aminokwasy	izleucyna, metionina, tryptofan, kwas glutaminowy
związki aromatyczne	fenole, limonen, kwas benzoesowy
kwasy organiczne	propionowy, malonowy, cytrynowy, octowy
witaminy	pirydoksyna, ryboflawina



czyszczeń organicznych w środowisku, ze względu na wykorzystywanie ich przez grzyby i bakterie jako źródła pozyskiwania energii (na drodze oddychania beztlenowego, fermentacji itp.) (WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Ten sposób bywa jednak limitowany np. nie utrzymywaniem się pożądaných szczepów na skażonym terenie, trudnościami w osiągnięciu biomasy wystarczającej do udostępnienia hydrofobowych zanieczyszczeń i ich transformacji (która w początkowych etapach jest zwykle trudna, energochłonna i powolna) (GLICK 2003). Mikrobiologiczna degradacja związków chemicznych zależy również, w dużym stopniu, od ich właściwości, np. zdolność do przekształceń fenoli zmniejsza się ze wzrostem stopnia metylacji cząsteczki i  $\log K_{ow}$ , a WWA wraz ze zwiększaniem się ilości pierścieni aromatycznych (bakterie najlepiej sobie radzą z 2-4 pierścieniowymi węglowodorami). W takich okolicznościach pozytywne efekty może dać umożliwienie roślinom współdziałania w remediacji, gdyż np. ich zdolności do degradacji fenoli zwiększają się właśnie ze wzrostem metylacji (CORIGIE i współaut. 2003, RASMUSSEN i OLSEN 2004).

#### Wpływ roślin na mikroorganizmy

Współpraca mikroorganizmów i roślin wyższych w fitoremediacji jest możliwa dzięki wspomnianemu już „efektowi ryzosfery”, który polega na zwiększonej częstości występowania w sąsiedztwie korzeni roślinnych bakterii i grzybów degradujących zanieczyszczenia (Tabela 2). Zjawisko to opisał pierwszy raz w 1946 r. Katznelson (HYNES i współaut. 2004). Ta charakterystyczna dystrybucja mikroorganizmów glebowych środowiska wzrostu rośliny, spowodowana jest korzystnym wpływem, jaki wywiera ona na to środowisko. Wzrost korzeni polepsza docieranie tlenu oraz infiltrację wody, powiększa również powierzchnię adhezyjną i głębokość występowania komórek bakterii i grzybów w glebie (ESCALANTE-ESPINOSA i współaut. 2005, KAIMI i współaut. 2006). Ponadto zademonstrowano chemotaksję różnych gatunków (np. *Pseudomonas alcaligenes*, *P. stutzeri* i *P. putida*) w kierunku substancji organicznych, uwalnianych i deponowanych w ryzosferze (HYNES i współaut. 2004, RENTZ i współaut. 2005, RUGH i współaut. 2005).

Tabela 2. Przykłady stosowanych w bioremediacji grzybów i bakterii (RÓŻAŃSKI 1998, SHROUT i współaut. 2006).

Mikroorganizm	Związek chemiczny
<b>GRZYBY</b>	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	TNT, PCB, PCDD i PCDF, 2, 4-DNT, PCP, WWA
<i>Phebia radiata</i> , <i>Pisohithus tinctorius</i> , <i>Paxillus involutus</i>	TNT
<i>Lentimla edodes</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> i <i>Rhizopus</i> sp.	węglowodory
<i>Trichoderma harzianum</i>	fenole
<i>Coriolus versicolor</i>	chlorofenol, chlorowane hydroksybifenyle
<b>BAKTERIE</b>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	TNT, 2, 4-DNT, 2-nitrotoluen, WWA
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>	paliwo diesla
<i>Comamonas testosteroni</i>	PCB
<i>Burkholderia</i> sp.	PCB, fenantren, piren, banzoantracen, fluoranten
<i>Flavobacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i> i <i>Acinetobacter</i> sp.	WWA
<i>Sphingomonas</i> sp.	fluoranten i inne węglowodory, PCDD, PCDF
<i>Metylobacterium</i> sp.	TNT, RDX, HMX

Eksudaty korzeniowe (wodnisty sok wydzielający się z przekroju korzenia po odcięciu łodygi na skutek działania ciśnienia korzeniowego) mogą być dla heterotroficznych mikroorganizmów dodatkowym źródłem węgla, azotu i energii. Rezultatem jest o 1–4 rzędy wielkości wyższe ich zagęszczenie w ryzosferze niż w „luźnej” ziemi (PILON-SMITS 2005, WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Znamienita jest również stymulacja przez rośliny wzrostu, a tym samym i aktywności mikroorganizmów degradujących zanieczyszczenia organiczne (WWA, PCB i inne). Na przykład, prawie 100% redukcja poziomu naftalenu w uprawianej, w porównaniu do 63% ubytku w nieuprawianej ziemi, uzyskano w eksperymencie z trawami *Bracharia serrata* i *Eleusine coracana* (gdzie w sposób sztuczny zanieczyszczono glebę 300mg/kg WWA) (MAILA i współaut. 2005). W obecności roślin zanotowano także znacznie większą biodegradację PCB. Po 4 miesiącach fitoremediacji, z udziałem *Phalaris arundinacea* i *Paricum virgatum*, gleby skażonej Arochlorem1248, stwierdzono 70% zmniejszenie stężenia tej substancji, a efekt uznano za konsekwencję współwystępowania roślin i mikroorganizmów i ich oddziaływań w ryzosferze (CHEKOL i współaut. 2004). Z kolei, w badaniach, w których podzielono otoczenie korzeni *Lolium perenne* na strefy odległości od ich powierzchni, wskazano na zależność intensywności biodegradacji fenantrenu od stwierdzonego gradientu stężenia eksudatów roślinnych, jak również CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> i związków azotu i fosforu. Przy nieobecności roślin mikroorganizmy heterotroficzne rozmieszczone były w glebie równomiernie, podczas gdy w obecności trawy wydzielane przez nią różne związki drobnocząsteczkowe spowodowały skupianie się degradujących WWA bakterii przy korzeniach. Uzyskano 90% degradację w odległości 0–3mm od ich powierzchni, a tylko 36% w odległości 6–9mm (CORGIE i współaut. 2003). Hipotezy wyjaśniające obserwacje zwiększonego usuwania różnych związków organicznych z ryzosfery dotyczą, między innymi, dużo większej populacji bakterii zdolnych do ich rozkładu, indukowania enzymów katabolicznych (dehydrogenaz, dioksygenaz itp.), zjawiska kometabolizmu tych związków i zwiększonej ich biodostępności itp. (PILON-SMITS 2005, RENTZ i współaut. 2005, RUGH i współaut. 2005). Niektóre z nich znalazły już potwierdzenie w wynikach, przeprowadzonych ostatnio badań. Zmiany w strukturze

populacji mikroorganizmów spowodowane przez określony gatunek rośliny mogą się przyczynić do bardziej wydajnej degradacji danego zanieczyszczenia. W 7-tygodniowym eksperymencie z *Lolium perenne* i *Medicago sativa*, w ryzosferze obu roślin (uprawianych razem, jak i każdy gatunek osobno) uzyskano znaczny wzrost ilości grzybów oraz bakterii heterotroficznych i metabolizujących ropę naftową. Z porównania składu populacji mikroorganizmów wywnioskowano, że *L. perenne* najbardziej promował wzrost bakterii degradujących heksadekan, natomiast *M. sativa*, tych rozkładających paliwo diesla. Z czasem rozwijania się roślin i wykształcania ryzosfery obserwowano coraz bardziej selektywne, określone efekty jej wpływu na zasiedlające ją organizmy, a ostateczne różnice w składzie ich populacji przypisano, między innymi zróżnicowanym gatunkowo eksudatom korzeniowym. Ten mechanizm, a więc wzbogacenie swojego otoczenia genotypami bakterii zdolnych do rozkładu kontaminacji, może być sposobem obrony roślin (KIRK i współaut. 2005). Znanne są również wyniki badań dotyczących kometabolizmu benzo[a]pirenu przez bakterię *Sphingomonas yanoikuyanae*, u której wydzieliny różnych roślin wspomagały, co prawda wzrost, lecz hamowały ekspresję genów potrzebnych do degradacji tego węglowodoru (RENTZ i współaut. 2005). Produkty roślinne nie zawsze indukują zwiększone usuwanie związków, takich jak np. WWA. Stanowią łatwiej osiągalne i przetwarzane przez bakterie źródło węgla i energii powodując zmniejszenie aktywności metabolicznej skierowanej na inne związki chemiczne. Stymulujące działanie ryzosfery może też polegać na mobilizacji potrzebnych genów, a ponieważ znajdują się one na chromosomie bakteryjnym lub na plazmidach, niekiedy odpowiednie warunki stworzone przez roślinę promują horyzontalny transfer tych genów, w ten sposób zwiększając częstość pojawiania się mikroorganizmów degradujących (RUGH i współaut. 2005). Kolejnym przykładem korzystnego efektu współdziałania roślin i mikroorganizmów w remediacji jest wykorzystanie eksudatów korzeniowych topoli *Populus deltoides x nigra* jako egzogenego źródła elektronów dla bakterii *Dechloromonas agitata* i *D. suillum* rozkładających perchlorat. Zdolność topoli do zwiększenia bioremediacji tego związku potwierdzono podczas 2-letnich badań polowych, kiedy 425 drzew „usunęło” 45% perchloratu

(dodawanego irygacyjnie w ilości 0,2528 kg/dzień) z powierzchni 0,28 hektara (SHROUT i współaut. 2006).

#### Wpływ mikroorganizmów na rośliny

Rola mikroorganizmów w efekcie ryzosfery i ich wpływ na procesy remediacji w niej zachodzące, może się przejawiać na dwa sposoby: bezpośrednio i pośrednio (GLICK 2003). Wspomagają one fitoremediację swoim potencjałem i możliwościami enzymatycznej katalizy przekształceń związków niemetalizowanych przez rośliny (działanie bezpośrednie). Ich aktywność przyczynia się też do redukcji fitotoksyczności zanieczyszczeń do poziomu umożliwiającego wrażliwym na nie roślinom wzrost, rozwój i remediację innych, towarzyszących im niebezpiecznych związków chemicznych (działanie pośrednie) (ESCALANTE-ESPINOSA i współaut. 2005). Korzenie kolonizowane mikroorganizmami stanowią układ korzystny dla obu jego uczestników. Ustabilizowana w ten sposób populacja bakterii czy grzybów lepiej degradowe toksyny, a także pomaga roślinie pobierać składniki z podłoża, przyczyniając się do jej wzrostu. Może też być pomocna w zwalczaniu chorób korzeni, hamować rozwój patogenów itp. Potwierdzono to np. w przypadku szczepu *Trichoderma harzianum*. Inokulacja ryzosfery młodych wierzb tym mikroorganizmem podnosiła żywotność siewek, a o 30% zwiększała wzrost roślin oraz długość korzeni. Umożliwiało to drzewom sięganie głębszych warstw gleby. Jednocześnie obserwowano ich wzrost zdolności w remediacji, gdyż *Trichoderma* jest odporna i detoksykuje związki takie, jak fenole, cyjanki, azotany (LYNCH i MOFFAT 2005, WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Mikroorganizmy wolnożyjące w ryzosferze także mogą stymulować fitoremediację, wspomagając egzystencję roślin w stresowych warunkach (GLICK 2003). Określa się je jako PGPR (ang. plant growth promoting rizobacteria), a zaliczyć do nich można, między innymi: różne szczepy *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Azospirillum brasilense*, *Serratia lignifaciens*, *Enterobacter cloace*. Lepszy wzrost roślin i ich korzeni, zaobserwowany w ich obecności, to efekt takich czynników jak np. wiązanie azotu z atmosfery, synteza sideroforów, ułatwiających roślinom pobieranie Fe, rozpuszczanie innych niezbędnych minerałów (HUANG i współaut. 2004, 2005; RADWAN i współaut. 2005). Potwierdzono również zdolność niektórych bakterii do wytwarzania fitohormonów stymulujących rozwój (kwasu

indolilo-3-octowego IAA), a także enzymów powodujących zahamowanie powstawania stresowych modulatorów w organizmie roślinnym. U wielu mikroorganizmów glebowych (np. u *Pseudomonas*, grzybów *Penicillium citrinum*, drożdży *Hansenula saturnus*) znaleziono ACC-deaminazę. Katalizuje ona przecięcie ACC (kwasu 1-amino-cyklopropa-1-karboksyłowego), prekursora etylenu. Zakłócenie szlaku biosyntezy tego związku obniża jego poziom w roślinie i znosi zahamowanie rozwoju, wydłużania się korzeni itp., uniemożliwiając normalny wzrost, w reakcji na stres (GLICK 2003). Zbadanie wpływu zanieczyszczeń węglowodorowych na 3 gatunki traw (*Festuca arundinacea*, *Poa pratensis* i *Elymus canadensis*) w czasie fitoremediacji uwidocznilo jeszcze jeden aspekt korzystnego wpływu obecności mikroorganizmów w ryzosferze. Zaobserwowano, iż w czasie ekspozycji roślin na ksenobiotyki może dochodzić do zwiększania się stosunku ilościowego chlorofilu a do b. Spowodowane jest to zahamowaniem transportu elektronów między fotosystemami fotosyntezy, wysyceniem i oksydacją kompleksu PSII połączonego z chlorofilem b. Inokulacja bakterii PGPR w ryzosferze *F. arundinacea* przeciwdziałała zwiększaniu się tego stosunku, będącego indykatorem stresu w roślinie. W jej następstwie zwiększał się poziom chlorofilu, a roślina zdawała się stosować strategię zmniejszania wzrostu pędów na rzecz korzeni, oraz następowało ograniczenie transportu zanieczyszczeń do górnych części, gdzie odbywa się fotosynteza. Dzięki większym korzeniom, zwiększało się z kolei pobieranie i zawartość wody w tkankach, co prowadziło do rozcieńczenia toksyn. Notowano również osiąganie większej biomasy przez wszystkie z badanych traw (nawet o 100%), a także znacznie wydajniejsze usuwanie zanieczyszczeń z gleby przez rośliny, którym w ryzosferze towarzyszyły bakterie (HUANG i współaut. 2004). PGPR mogą mobilizować niektóre nierozpuszczalne związki chemiczne i czynić je dostępnymi dla roślin. Wnioski takie wysnuto na podstawie wyniku doświadczenia, polegającego na usunięciu 70% ropy podczas fitoremediacji terenów pustynnych. Wskazano przy tym także, na stymulujący wpływ niskocząsteczkowych WWA (komponentów ropy naftowej) na wzrost i rozwój użytych tutaj roślin *Vicia faba*, jak i towarzyszących jej bakterii *Rhizobium leguminosarum* i innych. Przypisano to działaniu analogicznemu do fitohormonów względem roślin, a jako



źródło węgla i energii dla drugich organizmów. Inokulacja mikroorganizmami zwiększyła tutaj ponadto (w warunkach niskich stężeń węglowodorów) produktywność rośliny motylkowej, przejawiając się obfitością kwiatów i zawartością azotu w owocach (RADWAN i współaut. 2005).

Relacje między roślinami i mikroorganizmami glebowymi, zachodzące w ryzosferze, w oczywisty sposób przyczyniają się do efektywnego przebiegu fitoremediacji. Warto więc badać te interakcje w celu opracowania i zastosowania strategii i metod, które w pełni wykorzystająby potencjał tej współpracy. Wiadomo już np., że dobierając odpowiednią roślinę można powiększać populację mikroorganizmów odpowiedzialnych za procesy bioremediacji, a przy wykreowaniu adekwatnych warunków, możliwa jest również bioaugmentacja (sztuczne wzbogacenie ryzosfery w izolaty konkretnych szczepów). Korzyści, jakie czerpią organizmy z tego współżycia wskazują, że mogły one koewoluować razem i dostosowywać się do coraz pełniejszego wykorzystywania efektu, jaki stwarza ryzosfera (PILON-SMITS 2005, WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005).

#### MIKROORGANIZMY ENDOFITYCZNE

Interakcje roślin i mikroorganizmów mogą być jednak jeszcze ściślejsze. Obecnie dużo uwagi i spore nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystania w fitoremediacji bakterii endofitycznych (PILON-SMITS 2005, WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Podejście to zapewnia ominięcie problemów związanych z czynnikami niezbędnymi do kolonizacji przez mikroorganizmy powierzchni korzeni (odpowiednie pH gleby, temp., zawartość wody, wpływ innych organizmów obecnych w ryzosferze itp.) (GLICK 2004). Mikroorganizmy endofityczne są bardzo różnorodną grupą, rezydują wewnątrz tkanek żyjących roślin, bez znacznego ich uszkodzenia. Są pospolite u większości gatunków, bytując w nich latentnie lub aktywnie je kolonizując. Zidentyfikowanych i scharakteryzowanych jest np. około 150 różnych szczepów endofitów topoli

i wierzb. Donoszono o tak znacznych ich ilościach, jak  $10^3$ – $10^6$  komórek zajmujących system przewodzący (floem, ksylem) rośliny. Przy czym największe zagęszczenie występuje najczęściej w korzeniach i zmniejsza się progresywnie od pędów do liści (VAN DER LELIE i współaut. 2005). Jedną ze znanych bakterii endofitycznych jest *Methylobacterium*. Są to tlenowe, Gram-, pałeczkowate mikroorganizmy fakultatywnie metyloτροφiczne. Mogą rosnąć na takich związkach 1-węglowych, jak metanol, metyloamina, czy metan, wykorzystując je jako wyłączne źródło energii. Są rozpowszechnione w środowisku. Kolonizują korzenie roślin wodnych i ziemnych, zabarwiając je na kolor różowy/czerwony (zawierają karotenoidy). Zaobserwowano u nich dużą odporność na odwodnienie, mróz, światło UV, jonizację i wysoką temperaturę, a także zdolność do degradacji takich zanieczyszczeń organicznych, jak chlorek, bromek i jodek metylu, dichlorometan, MTBE i wiele innych. Endofityczny szczep *Methylobacterium* izolowany z liści i korzeni topoli był również badany w kontekście metabolizowania substancji wybuchowych. Jego czyste kultury w ciągu 55 dni całkowicie przetransformowały znakowany radioaktywnie 2,4,6-trinitrotoluen TNT, dodany do pożywki w stężeniu 25 mg/l, podobnie jak 20 mg/l RDX (Royal Demolition explosive, heksogen) i 2,5 mg/l HMX (oktogen). Zaznaczyć trzeba, iż tylko w przypadku RDX nastąpiła zupełna mineralizacja 58% podanego związku do  $\text{CO}_2$  (VAN AKEN i współaut. 2004). Innym gatunkiem endofitycznym, nad którego wykorzystaniem w ulepszaniu technik fitoremediacji pracuje się ostatnio jest *Burkholderia cepacia*. Niektóre jej szczepy mają zdolność degradowania toluenu, co zmniejsza jego fitowolatylizację do atmosfery (BARAC i współaut. 2004, BOUCARD i współaut. 2005, GLICK 2004, VAN DER LELIE i współaut. 2005, NEWMAN i REYNOLD 2005, WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Potwierdzono również możliwość jej udziału w mineralizacji 2,4-dichlorofenolu DCP w ryzosferze *Lolium perenne* (BOUCARD i współaut. 2005).

#### PODSUMOWANIE

Fitoremediacja jest jednym ze sposobów biologicznego oczyszczania środowiska, któremu poświęca się w ostatnim czasie sporo uwagi. Rośliny, jako organizmy prowadzące osiadły tryb życia, musiały wykształcić mecha-

nizmy obronne, umożliwiające przetrwanie nawet w ekstremalnych warunkach otoczenia, także tych stworzonych przez człowieka. Poprzez aktywny wpływ na zachodzące w nim procesy chemiczne, fizyczne i biologicz-

ne, starają się realizować własny cykl życiowy. Technologie fitoremediacyjne opierają się na takich właściwościach niektórych roślin, jak: tolerancja dużych stężeń związków toksycznych, ich pobieranie i akumulacja w częściach zbieranych, przekształcanie tych substancji wewnątrz lub pozakomórkowo. Analizy i badania prowadzone w wielu dziedzinach nauki, takich jak chemia, fizjologia, biochemia itp., doprowadziły do dokładniejszego poznania różnych mechanizmów, procesów i oddziaływań składających się na te zjawiska. Dzięki temu jesteśmy obecnie w stanie w sposób bardziej świadomy i ukierunkowany wykorzystywać naturalne moż-

liwości roślin, a także mikroorganizmów, i planować optymalne strategie remediacji danego zanieczyszczenia, terenu czy ekosystemu. Dodatkowo wiele możliwości stwarza rozwój biotechnologii i inżynierii genetycznej. Wprowadzanie do roślin nowych genów, na przykład pochodzących z bakterii, i warunkujących odporność bądź zdolność do degradacji określonych związków chemicznych pozwala na rozkład zanieczyszczeń, które dotąd stanowiły problem. Temat wykorzystania transgenicznych roślin w fitoremediacji szerzej omówiono w artykułach WÓJCIKA i TOMASZEWSKIEJ (2005) oraz ZEMLEDUCH i TOMASZEWSKIEJ (2007b) (w druku).

## MECHANISMS, PROCESSES AND INTERACTIONS DURING PHYTOREMEDIATION

### Summary

The following factors inhibit the use of plants for the recultivation of the environment contaminated with organic compounds: their bioavailability, take-up, transport, and accumulation. Moreover, a very important factor that affects effective phytoremediation process is phytotoxic influence of the uptaken chemical compounds on the plant's physi-

ological and biochemical processes. Before infiltration into a plant, detoxification system is activated, which causes the following impact in rhizosphere: liberation of xenobiotics-degrading enzymes through plant roots into rhizosphere and collaboration of microorganisms and higher plants.

### LITERATURA

- ALKIO M., TABUCHI T. M., WANG X., COLON-CARMONA A., 2005. *Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms*. J. Exp. Bot. 56, 421, 2983-2994.
- ASAI K., TAKAGI K., SHIMOKAWA M., SUE T., HIBI A., HIRUTA T., FUJIHIRO S., NAGASAKA H., HISAMATSU S., SONOKI S., 2002. *Phytoaccumulation of coplanar PCBs by Arabidopsis thaliana*. Environ. Pollut. 120, 509-511.
- BARAC T., TAGHAVI S., BORREMANS B., PROVOOST A., OEYEN L., COLPAERT J. V., VANGRONSVELD J., VAN DER LELIE D., 2004. *Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants*. Nature Biotechnol. 22, 583-588.
- BARBOUR J. P., SMITH J. A., CHOIU C. T., 2005. *Sorption of aromatic organic pollutants to grasses from water*. Environ. Sci. Technol. 39, 8369-8373.
- BOUCARD T. K., BARDGETT R. D., JONES K. C., SEMPLE K. T., 2005. *Influence of plants on the chemical extractability and biodegradability of 2, 4-dichlorophenol in soil*. Environ. Pollut. 133, 53-62.
- BURKEN J. G., MA X., STRUCKHOFF G. C., GILBERTSON A. W., 2005. *Volatile organic compound fate in phytoremediation applications: natural and engineered systems*. Z. Naturforsch. 60C, 208-215.
- CHEKOL T., VOUGH L. R., CHANEY R. L., 2004. *Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils: the rhizosphere effect*. Environ. Internat. 30, 799-804.
- COLEMAN J. O. D., BLAKE-KALFF M. M. A., DAVIES T. G. E., 1997. *Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation*. Trends Plant Sci. 2, 4, 144-151.
- COLLINS C., FRYER M., GROSSO A., 2006. *Plant uptake of non-ionic organic chemicals*. Environ. Sci. Technol. 40, 45-52.
- CORGIE S. C., JONER E. J., LEYVAL C., 2003. *Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots*. Plant Soil 257, 143-150.
- DURAN N., ESPOSITO E., 2000. *Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review*. Appl. Catalysis B; Environ. 28, 83-99.
- EKMANN D. R., LORENZ W. W., PRZYBYLA A. E., WOLFE N. L., DEAN J. F. D., 2003. *SAGE analysis of transcriptome responses in Arabidopsis roots exposed to 2,4, 6-trinitrotoluene*. Plant Physiol. 133, 1397-1406.
- ESCALANTE-ESPINOSA E., GALLEGOS-MARTINEZ M. E., FAVEL A., TORRES E., GUTIERREZ-ROJAS M., 2005. *Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by Cyperus laxus Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system*. Chemosphere 59, 405-413.
- FAVA F., BERSELLI S., CONTE P., PICCOLO A., MARCHETTI L., 2004. *Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. Biotechnol. Bioeng. 88, 214-223.
- FISMES J., PERRIN-GANIER C., EMPEREUR-BISSONNET P., MOREL J. L., 2002. *Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils*. J. Environ. Qual. 31, 1649-1656.

- GADD G. M., 2001. *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- GAO Y., ZHU L., 2004. *Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils*. Chemosphere 55, 1169-1178.
- GLICK B. R., 2003. *Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment*. Biotechnol. Adv. 21, 383-393.
- GLICK B. R., 2004. *Teamwork in phytoremediation*. Nature Biotechnology 22, 526-527.
- HUANG X.-D., EL-ALAWI Y., GURSKA J., GLICK B. R., GREENBERG B. M., 2005. *A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils*. Microchem. J. 81, 139-147.
- HUANG X.-D., EL-ALAWI Y., PENROSE D. M., GLICK B. R., GREENBERG B. M., 2004. *Responses of three grass species to creosote during phytoremediation*. Environ. Pollut. 130, 453-463.
- HYNES R. K., FARRELL R. E., GERMIDA J. J., 2004. *Plant-assisted degradation of phenanthrene as assessed by solid-phase microextraction (SPME)*. Int. J. Phytoremed. 6, 253-268.
- JANSEN M. A. K., HILL L. M., THORNELEY R. N. F., 2004. *A novel stress-acclimation response in Spirodela punctata (Lemnaceae): 2,4, 6-trichlorophenol triggers an increase in the level of an extracellular peroxidase, capable of the oxidative dechlorination of this xenobiotic pollutant*. Plant Cell Environ. 27, 603-613.
- KAIMI E., MUKAIDANI T., MIYOSHI S., TAMAKI M., 2006. *Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil*. Environ. Exp. Bot. 55, 110-119.
- KELSEY J. W., WHITE J. C., 2005. *Multi-species interactions impact the accumulation of weathered 2, 2-bis (p-chlorophenyl)-1, 1-dichloroethylene (p,p'-DDE) from soil*. Environ. Pollut. 137, 222-230.
- KIM J., SUNG K., CORAPCIOGLU M. Y., DREW M. C., 2004. *Solute transport and extraction by a single root in unsaturated soils: model development and experiment*. Environ. Pollut. 131, 61-70.
- KIRK J. L., KLIRONOMOS J. N., LEE H., TREVORS J. T., 2005. *The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil*. Environ. Pollut. 133, 455-465.
- KOMIVES T., GULLNER G., 2005. *Phase I xenobiotic Metabolic Systems in Plants*. Z. Naturforsch. 60C, 179-185.
- KOPCEWICZ J., 2002. *Fizjologia roślin*. PWN, Warszawa
- KREUZ K., TOMMASINI R., MARTINOIA E., 1996. *Old enzymes for a new job (Herbicide detoxification in plants)*. Plant Physiol. 111, 349-353.
- LI H., SHENG G., CHIOU C. T., XU O., 2005. *Relation of organic contaminant equilibrium sorption and kinetic uptake in plants*. Environ. Sci. Technol. 39, 4864-4870.
- LUNNEY A. I., ZEEB B. A., REIMER K. J., 2004. *Uptake of weathered DDT in vascular plants: potential for phytoremediation*. Environ. Sci. Technol. 38, 6147-6154.
- LYNCH J. M., MOFFAT A. J., 2005. *Bioremediation – prospects for the future application of innovative applied biological research*. Ann. Appl. Biol. 146, 217-221.
- MA X., BURKEN J., 2004. *Modeling of TCE diffusion to the atmosphere and distribution in plant stems*. Environ. Sci. Technol. 38, 4580-4586.
- MA X., RICHTER A. R., ALBERS S., BURKEN J. G., 2004. *Phytoremediation of MTBE with hybrid poplar trees*. Int. J. Phytoremed. 6, 157-167.
- MAILA M. P., RANDIMA P., CLOETE T. E., 2005. *Multi-species and monoculture rhizoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the soil*. Int. J. Phytoremed. 7, 87-98.
- MCCUTCHEON S. C., SCHNOOR J. L., 2003. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, Wiley-Interscience, New York.
- MEADE T., D'ANGELO E. M., 2005. *[<sup>14</sup>C]Pentachlorophenol mineralization in the rice rhizosphere with established oxidized and reduced soil layers*. Chemosphere 61, 48-55.
- MENDEWAB A., CARDOZA V., STEWART JR. C. N., 2005. *Genomic analysis of the response of Arabidopsis thaliana to trinitrotoluene as revealed by cDNA microarrays*. Plant Sci. 168, 1409-1424.
- MEZZARI M. P., WALTERS K., JELINKOVA M., SHIH M.-C., JUST C. L., SCHNOOR J. L., 2005. *Gene expression and microscopic analysis of Arabidopsis exposed to chloroacetanilide herbicides and explosive compounds. A phytoremediation approach*. Plant Physiol. 138, 858-869.
- MITSOU K., KOULIANOU A., LAMBROPOULOU D., PAPPAS P., ALBANIS T., LEKKA M., 2006. *Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanilin in the aquatic plant Lemna minor*. Chemosphere 62, 275-284.
- NEWMAN L. A., REYNOLD C. R., 2005. *Bacteria and phytoremediation: new use for endophytic bacteria in plants*. Trends Biotechnol. 23, 6-8.
- PARRISH Z. D., BANKS M. K., SCHWAB A. P., 2005. *Assessment of contaminant lability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil*. Environ. Pollut. 137, 187-197.
- PILON-SMITS E., 2005. *Phytoremediation*. Ann. Rev. Plant Biol. 56, 15-39.
- RADWAN S. S., DASHTI N., EL-NEMR I. M., 2005. *Enhancing the growth of Vicia faba plants by microbial inoculation to improve their phytoremediation potential for oily desert areas*. Int. J. Phytoremed. 7, 19-32.
- RASMUSSEN G., OLSEN R. A., 2004. *Sorption and biological removal of creosote-contaminants from groundwater in soils and vegetated with orchard grass (Dactylis glomerata)*. Adv. Environ. Res. 8, 313-327.
- RENTZ J. A., ALVAREZ P. J. J., SCHNOOR J. L., 2005. *Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation*. Environ. Pollut. 136, 477-484.
- RÓŻAŃSKI L., 1998. *Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku*. Agra Envirolab, Poznań.
- RUGH C. L., SUSILAWATI E., KRAVCHENKO A. N., THOMAS J. C., 2005. *Biodegrader metabolic expansion during polyaromatic hydrocarbons rhizoremediation*. Z. Naturforsch. 60C, 331-339.
- SANDERMANN JR. H., 1994. *Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept*. Pharmacogenetics 4, 225-241.
- SHROUT J. D., STRUCKHOFF G. C., PARKIN G. F., SCHNOOR J. L., 2006. *Stimulation and molecular characterization of bacterial perchlorate degradation by plant-produced electron donors*. Environ. Sci. Technol. 40, 310-317.
- SONOKI T., KAJITA S., IKEDA S., UESUGI M., TATSUMI K., KATAYAMA Y., IIMURA Y., 2005. *Transgenic tobacco expressing fungal laccase promotes the detoxification of environmental pollutants*. App. Microbiol. Biotechnol. 67, 138-142.
- STOTTMEISTER U., WIESSNER A., KUSCHK P., KAPPELMAYER U., KASTNER M., BEDERSKI O., MULLER R. A., MOORMANN H., 2003. *Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment*. Biotechnol. Adv. 22, 93-117.



- SU Y.-H., ZHU Y.-G., 2006. *Bioconcentration of atrazine and chlorophenols into roots and shoots of rice seedlings*. Environ. Pollut. 139, 32-39.
- SZWEYKOWSCY A., J., 2003. *Botanika. Morfologia*. PWN, Warszawa.
- SZWEYKOWSKA A., 1997. *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- TAO S., JIAO X. C., CHEN S. H., XU F. L., LI Y. J., LIU F. Z., 2006. *Uptake of vapor and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons by cabbage*. Environ. Pollut. 140, 13-15.
- VAN AKEN B., YOON J. M., SCHNOOR J. L., 2004. *Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5, 7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic Methylobacterium sp. associated with poplar tissues (Populus deltoides x nigra DN34)*. App. Environ. Microbiol. 70, 508-517.
- VAN DER LELIE D., BARAC T., TAGHAVI S., VANGRONSVELD J., 2005. *Response to Newman: New uses of endophytic bacteria to improve phytoremediation*. Trends Biotechnol. 23, 8-9.
- WALKER C. H., HOPKIN S. P., SIBLY R. M., PEAKALL D. B., 2002. *Podstawy ekotoksykologii*. PWN, Warszawa.
- WANG G.-D., LI Q.-J., LUO B., CHEN X.-Y., 2004. *Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase*. Nature Biotechnol. 22, 893-897.
- WANG X., WHITE J. C., GENT M. P. N., IANNUCCI-BERGER W., EITZER B. D., INCORVIA MATTINA M. J., 2004. *Phytoextraction of weathered p,p'-DDE by zucchini (Cucurbita pepo) and cucumber (Cucumis sativus) under different cultivation conditions*. Int. J. Phytoremed. 6, 363-385.
- WHITE J. C., INCORVIA MATTINA M. J., LEE W.-J., EITZER B. D., IANNUCCI-BERGER W., 2003. *Role of organic acids in enhancing the desorption and uptake of weathered p,p'-DDE by Cucurbita pepo*. Environ. Pollut. 124, 71-80.
- WILD E., DENT J., BARBER J. L., THOMAS G. O., JONES K. C., 2004. *A novel analytical approach for visualizing and tracking organic chemicals in plants*. Environ. Sci. Technol. 38, 4195-4199.
- WILD E., DENT J., BARBER J. L., THOMAS G. O., JONES K. C., 2005. *Real-time visualization and quantification of PAH photodegradation on and within plant leaves*. Environ. Sci. Technol. 39, 268-273.
- WILD E., DENT J., BARBER J. L., THOMAS G. O., JONES K. C., 2005. *Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots*. Environ. Sci. Technol. 39, 3695-3702.
- WILD E., DENT J., BARBER J. L., THOMAS G. O., JONES K. C., 2006. *Visualizing the air-to-leaf transfer and within-leaf movement and distribution of phenanthrene: further studies utilizing two-photon excitation microscopy*. Environ. Sci. Technol. 40, 907-916.
- WÓJCIK P., TOMASZEWSKA B., 2005. *Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych*. Biotechnologia 4, 158-173.
- ZEMLEDUCH A., TOMASZEWSKA B., 2007. *Komórkowy system detoksykacji zanieczyszczeń organicznych u roślin*. Post. Biol. Kom. 34, 635-649.
- ZEMLEDUCH A., TOMASZEWSKA B., 2007. *Organizmy modyfikowane genetycznie w fitoremediacji związków organicznych*. Biotechnologia 4.