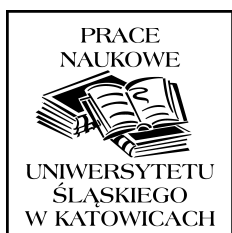


Eugeniusz Małkowski

**Modyfikacja procesu transpiracji
a efektywność indukowanej fitoekstrakcji
ołowiu i kadmu
w wybranych gatunkach roślin**



**Modyfikacja procesu transpiracji
a efektywność indukowanej fitoekstrakcji
ołowiu i kadmu
w wybranych gatunkach roślin**



NR 2842

Eugeniusz Małkowski

**Modyfikacja procesu transpiracji
a efektywność indukowanej fitoekstrakcji
ołowiu i kadmu
w wybranych gatunkach roślin**

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego



Katowice 2011

Redaktor serii: Biologia
Iwona Szarejko

Recenzenci
Danuta Maria Antosiewicz
Anna Tukiendorf

Spis treści

Podziękowania	7
Wykaz skrótów	9
1. Wstęp	11
1.1. Ołów i kadm w środowisku glebowym	11
1.2. Fizykochemiczne metody oczyszczania gleb z metali	13
1.3. Fitoremediacja jako metoda oczyszczania środowiska	14
1.3.1. Metody fitoremediacji	15
1.3.1.1. Fitodegradacja	15
1.3.1.2. Fitofiltracja	16
1.3.1.3. Fitoulatnianie	18
1.3.1.4. Fitochemostabilizacja	18
1.3.1.5. Fitoekstrakcja	23
1.4. Pobieranie Pb i Cd przez korzenie roślin i ich transport do pędów	38
1.5. Poglądy na rolę transpiracji w indukowanej fitoekstrakcji Pb i Cd	42
1.5.1. Związki modyfikujące natężenie transpiracji oraz rola transpiracji w indukowanej fitoekstrakcji Pb i Cd	44
2. Cel badań	49
3. Materiał i metody	51
3.1. Doświadczenia w kulturach hydroponicznych i doświadczenia wazonowe	51
3.1.1. Materiał roślinny	51
3.1.2. Doświadczenia w kulturach hydroponicznych	52
3.1.2.1. Uprawa roślin	53
3.1.2.2. Traktowanie roślin fuzikokcyną (FC) i KCl oraz pomiar transpiracji	54
3.1.3. Doświadczenia wazonowe	57
3.1.3.1. Przygotowanie gleby oraz uprawa roślin	57
3.1.3.2. Traktowanie roślin fuzikokcyną (FC), kwasem abscysynowym (ABA), KCl i glifosatem (Glif)	58
3.1.3.3. Pomiar transpiracji	60
3.2. Badania na poziomie tkankowym	61

3.2.1.	Uprawa siewek kukurydzy i przygotowanie segmentów koleoptyli	62
3.2.2.	Inkubacja segmentów	62
3.3.	Metody analityczne	64
4.	Wyniki	66
4.1.	Wpływ FC i KCl na transpirację oraz zawartość Pb, Cd, K, Ca i Zn w pędach gorczycy sarepskiej — badania w kulturach hydroponicznych .	66
4.1.1.	Transpiracja gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce podstawowej lub w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn	67
4.1.1.1.	Dynamika zmian transpiracji	67
4.1.1.2.	Całkowita ilość wytranspirowanej wody w czasie trwania eksperymentu (w ciągu 49 godzin)	73
4.1.2.	Akumulacja Pb i Cd w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn	76
4.1.3.	Akumulacja K, Ca i Zn w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce podstawowej lub w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn	79
4.1.4.	Zależność między zawartością Pb, Cd, K, Ca i Zn w pędach gorczycy sarepskiej a transpiracją	82
4.2.	Wpływ FC, KCl, ABA, glifosatu i EDTA na transpirację oraz akumulację Pb i Cd w pędach gorczycy sarepskiej i słonecznika — badania w kulturach wazonowych	86
4.2.1.	Wpływ FC, KCl, ABA i EDTA na transpirację	87
4.2.1.1.	Dynamika zmian transpiracji	87
4.2.1.2.	Całkowita ilość wytranspirowanej wody	91
4.2.2.	Wpływ FC, KCl, ABA, EDTA i glifosatu (Glif) na akumulację Pb i Cd .	94
4.3.	Wpływ Pb, EDTA i glifosatu na akumulację Pb, Ca i K w segmentach koleoptyli kukurydzy — badania na poziomie tkankowym	98
5.	Dyskusja	102
5.1.	Zależność między transpiracją a akumulacją Pb i Cd w pędach roślin z indukowaną hyperakumulacją metali	103
5.2.	Problemy związane ze stosowaniem fitoekstrakcji w warunkach polowych	116
5.2.1.	Możliwość ługowania metali w glebie przez nadmiar związków chelatujących	116
5.2.2.	Zagospodarowanie zanieczyszczonego plonu po procesie fitoekstrakcji .	118
6.	Wnioski	121
	Literatura	123
	Summary	153
	Zusammenfassung	155

Podziękowania

Pragnę podziękować wszystkim pracownikom Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego, którzy w jakikolwiek sposób przyczynili się do powstania niniejszej monografii.

Serdecznie dziękuję Pani dr Aleksandrze Sas-Nowosielskiej z Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowionych (IETU) za włączenie mnie do Zespołu Fitoremediacji IETU, dzięki czemu mogłem prowadzić badania nad fitoremediacją w ramach międzynarodowych projektów. Chcę również gorąco podziękować byłym dyrektorom IETU Pani prof. dr hab. Ewie Marchwińskiej i Panu prof. dr hab. Jackowi Łącznemu za możliwość wykonywania eksperymentów w kulturach hydroponicznych oraz doświadczeń wazonowych w laboratoriach Instytutu. Podziękowania należą się także Pani Beacie Kokoszy-Gnyp i Panu Norbertowi Słaboniowi za techniczną pomoc w trakcie prowadzenia eksperymentów w IETU.

Pani dr Halinie Lekacz jestem wdzięczny za to, że nauczyła mnie, jak należy rzetelnie prowadzić badania naukowe i sporządzać z nich notatki. Dzięki temu radziłem sobie nawet z „powodzia” danych. Panu mgr. Edwardowi Kudelskiemu dziękuję za pomoc w „przegryzaniu się” przez program Statistica oraz cierpliwość w przekonywaniu mnie, że komputer naprawdę ułatwia pracę naukową. W efekcie nie pozostaje mi nic innego, jak tylko „pokochać” to urządzenie oraz ze spokojem zapoznawać się z kolejnymi wersjami różnych programów. Pani dr Joannie Szymanowskiej-Pułce jestem wdzięczny za czas spędzony na wyjaśnianiu mi, że statystyka nie jest taka „straszna”. Mam nadzieję, że nie będą to stracone godziny. Gorące podziękowania należą się także recenzentom wydawniczym mojej rozprawy Paniom prof. dr hab. Annie Tukiendorf oraz dr hab. Marii Antosiewicz, których cenne, chociaż czasem bardzo krytyczne uwagi przyczyniły się do uporządkowania materiału pracy, a w konsekwencji do powstania ostatecznej wersji niniejszej monografii.

Wykaz skrótów

ABA	— kwas abscysynowy, fitohormon — inhibitor wzrostu, regulator zamykania szparek
ANOVA	— analiza wariancji
APW	— sztuczna woda stawowa (<i>artificial pond water</i>), roztwór standardowo stosowany do inkubacji fragmentów tkanek
BS	— błąd standardowy
CDTA	— (kwas <i>trans</i> -1,2-cykloheksylenodinitrilotetraoctowy), związek chelatujący
Cytokin	— mieszanina różnych cytokinin, produkowana przez Miler Chemical & Fertilizer Corporation (USA)
DTPA	— (kwas dietylenotriaminopentaoctowy), związek chelatujący
EDDHA	— (kwas etylenodiamino-N,N'-bis(2-hydroksyfenylooctowy)), związek chelatujący
EDDS	— (kwas N,N'-etylenodiaminodibursztynowy), związek chelatujący
EDTA	— kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy, związek chelatujący
EGTA	— (kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetylo)-N,N,N',N'-tetraoctowy), związek chelatujący
FC	— fuzikokcyna, toksyna grzybowa, stymulator wzrostu roślin i otwierania szparek
GA ₃	— kwas giberelinowy
Glif	— glifosat, N-(fosfonometyl)glicyna, herbicyd, między innymi silnie hamujący transpirację
HBED	— (kwas N,N'-bis(2-hydroksybenzylo)etylenodiamino-N,N'-dioctowy), związek chelatujący
HEDTA	— (kwas N-(2-hydroksyetylo)-etylenodiaminotrioctowy), związek chelatujący

HEIDA	— (kwas N-(2-hydroksytylo)iminodioctowy), związek chelatujący
IAA	— kwas indolilo-3-octowy, auksyna
NAA	— kwas naftylo-1-octowy, auksyna
NTA	— (kwas nitrylotrioctowy), związek chelatujący
pmH ⁺ -ATPaza	— plazmolemowa H ⁺ -ATPaza
Phytagro	— mieszanina giberelin, auksyn, cytokinin, witamin oraz B i Zn, produkowana przez Miler Chemical & Fertilizer Corporation (USA)
Pożywka EDTA/Pb/Cd/Zn	— pożywka podstawowa, zawierająca niezbędne makro- i mikroelementy oraz wprowadzone do- datkowo EDTA, Pb, Cd i Zn
Test NIR	— test najmniejszej istotnej różnicy

1. Wstęp

1.1. Ołów i kadm w środowisku glebowym

Metale mogą dostawać się do gleby w wyniku wietrzenia skał macierzystych, z których powstała gleba, opadu atmosferycznych pyłów i deszczy, rozłożonego materiału biologicznego lub w rezultacie działalności różnorodnych źródeł antropogenicznych (Kabata-Pendias, Pendias, 1999). W przypadku naturalnych źródeł stężenia metali w glebach z reguły nie są wysokie i nie stanowią zagrożenia dla organizmów żywych (Ross, 1994a; Kabata-Pendias, Pendias, 1999). Takie ilości metali w glebach z obszarów słabo lub niezanieczyszczonych w wyniku działalności człowieka uznawane są za naturalne i określane jako tło geochemiczne. W przypadku gleb polskich dla takich metali, jak Cd i Pb, określono ich tła geochemiczne na poziomie (mg/kg gleby): Cd 0,20—0,22, Pb 14—20 (Terelak i współpr., 1997a; Kabata-Pendias, Pendias, 1999). Na terenach niezanieczyszczonych przez przemysł można też spotkać pewne obszary, na których pokłady rud metali usytuowane są w powierzchniowych warstwach skorupy ziemskiej i w związku z tym koncentracje metali w tych glebach są wysokie (Karczewska i współpr., 2006). W takich miejscach, z reguły o niewielkiej powierzchni, rozwój większości gatunków roślin jest ograniczony lub niemożliwy. Występują tam specyficzne gatunki lub ekotypy gatunków pospolitych, wykazujące odporność na metale (Ernst, 1990; Rostański, 1997; Brej, 1998; Grodzińska i współpr., 2000; Reeves, Baker, 2000; Szarek-Łukaszewska, Niklińska, 2002; Wierzbička, Rostański, 2002).

Natomiast znacznie większe obszary zajmują gleby z wyższą w stosunku do tła geochemicznego zawartością metali, będącą wynikiem przemysłowej i gospodarczej działalności człowieka. W rezultacie emisji zanieczyszczeń ze źródeł antropogenicznych (kopalnie, huty metali nieżelaznych) dochodzi bardzo często, szczególnie wokół emitorów, do znacznego nagromadzenia w glebach Cd i Pb (Kucharski i współpr., 1994; Ross, 1994a; Terelak i współpr.,

1997b; Palowski i wspólr., 2001; Gancarczyk-Gola, Palowski, 2005; Kucharski i wspólr., 2005; Karczewska i wspólr., 2006). W południowej Polsce, gdzie prawie w całości zlokalizowany jest przemysł związany z wydobywaniem i przerobem metali nieżelaznych, koncentracje wymienionych metali ciężkich w glebach położonych wokół kopalń i hut metali nieżelaznych wielokrotnie przekraczają tło geochemiczne i wynoszą (mg/kg gleby): Cd 50—778; Pb 1 720—14 654 (Gzyl, 1995; Terelak i wspólr., 1997a; Brej, 1998; Kucharski i wspólr., 2005; Karczewska i wspólr., 2006; Gucwa-Przepióra i wspólr., 2007). Zawartości wymienionych pierwiastków mogą być jeszcze wyższe w podłożu zwałowisk hutniczych i kopalnianych (Kabata-Pendias, 1977; Godzik, 1993; Gucwa-Przepióra, Turnau, 2001; Karczewska i wspólr., 2006). Bardzo wysokie koncentracje metali w glebach spotyka się także w innych rejonach świata, gdzie wydobywano i wytapiano rudy metali nieżelaznych. W Palmerton (USA), wokół dawnej huty cynku i ołowiu, stwierdzono Pb w ilościach 200—1 100 mg/kg gleby, a Cd — 900—1 500 mg/kg gleby (Ross, 1994a). Tak duże ilości Cd i/lub Pb w podłożu mają negatywny wpływ na organizmy żywe. Badania zarówno w kulturach hydroponicznych, jak i w substracie glebowym wykazały, że wysokie stężenia tych metali powodują:

- zmniejszenie liczby mikroorganizmów i obniżenie aktywności wielu enzymów glebowych (np. Wyszowska, Wyszowski, 2002; Piotrowska-Seget i wspólr., 2005);
- słabszy wzrost i plonowanie roślin (np. Jasiewicz, Antonkiewicz, 2000; Kurtyka i wspólr., 2008);
- zaburzenia gospodarki wodnej i mineralnej roślin (np.: Antosiewicz, 1993; Burzyński, Buczek, 1998; Małkowski i wspólr., 2002);
- zaburzenia aktywności fotosyntetycznej i oddechowej roślin (np. Romanowska i wspólr., 2002; Dążkiewicz i wspólr., 2003);
- zaburzenia funkcjonowania jądra komórkowego (np. Gabara, Krajewska, 1997; Wierzbińska, 1999).

Wykazano także, że gleby zanieczyszczone Cd i/lub Pb stanowią poważne zagrożenie zarówno dla organizmów zwierzęcych, jak i dla zdrowia ludzi (Fergusson, 1991). Jeśli chodzi o ludzi, to Pb wpływa negatywnie na centralny (dzieci) i obwodowy układ nerwowy (dorośli), uszkadza układ sercowo-naczyniowy, nerki, zaburza metabolizm lipidów i przyczynia się do powstawania osteoporozy. Jednym z charakterystycznych objawów toksycznego działania Pb na organizm ludzki jest niedokrwistość wywołana inhibicją syntezy hemu (Chmielnicka, 1994). Ponadto Pb wykazuje interakcję z różnymi biopierwiastkami, takimi jak: Ca, Cu, Zn, Fe i Mg, oddziałując negatywnie na funkcjonowanie wielu metaloenzymów (Moniuszko-Jakoniuk, Brzóska, 1997). Z kolei Cd wywołuje u ludzi nadciśnienie, uszkadza nerki,

powoduje osteomalację lub osteoporozę i jest czynnikiem rakotwórczym (Nicolas, Descotes, 1996). W związku z tym konieczne staje się obniżenie stężenia tych metali w glebach lub przynajmniej ograniczenie ich biodostępności.

1.2. Fizykochemiczne metody oczyszczania gleb z metali

Wiele metod fizykochemicznych umożliwia usunięcie metali ciężkich z gleb lub ich immobilizację. Do najczęściej opisywanych należą: zestalanie, witryfikacja, ekstrakcja termalna, metoda elektrokinetyczna, przemywanie lub usuwanie wierzchniej warstwy gleby (Dushenkov i współpr., 1997a; Vangronsveld, Cunningham, 1998; Blaylock, 2000; Mulligan i współpr., 2001a i b). Zestalanie (ang. *solidification*) polega na wymieszaniu zanieczyszczonej gleby z cementem, pucolanami, bitumem lub wprowadzeniu do gleby w postaci płynnej innych materiałów podlegających polimeryzacji. Uzyskuje się w ten sposób zestaloną masę, w której metale ciężkie zostają związane i podlegają ługowaniu w bardzo ograniczonym zakresie (Vangronsveld, Cunningham, 1998; Mulligan i współpr., 2001a i b; Chen i współpr., 2009). Witryfikacja (ang. *vittrification*) związana jest z poddaniem gleby działaniu temperatury w zakresie od 1 600°C do 3 000°C, w wyniku czego wszystkie składniki gleby, łącznie z krzemionką, ulegają stopieniu. Po zastygnięciu otrzymuje się szklistą masę z uwiecznionymi w niej metalami, które praktycznie nie podlegają ługowaniu pod wpływem różnych czynników środowiska (Vangronsveld, Cunningham, 1998; Holger i współpr., 2001; Mulligan i współpr., 2001a i b). Ekstrakcję termalną (ang. *thermal extraction, thermal treatment*) przeprowadza się w specjalnych urządzeniach, w temperaturze od 200°C do 800°C. W trakcie podgrzewania gleby metale przechodzą w stan lotny, a następnie są odzyskiwane. Metoda ta jest bardzo efektywna w przypadku Hg, natomiast inne metale, jak: Pb, Cd czy Cr, odzyskiwane są tylko częściowo. W związku z tym pozostała po ekstrakcji termalnej gleba musi być składowana lub zagospodarowana w bezpieczny sposób (Vangronsveld, Cunningham, 1998; Mulligan i współpr., 2001a i b). Metoda elektrokinetyczna (ang. *elektrokinetics, electroreclamation*) polega na wprowadzeniu do zanieczyszczonej, wilgotnej gleby elektrod i przepuszczaniu przez nią prądu stałego o niskim natężeniu. Jony oraz inne mające ładunek cząsteczki przemieszczają się w roztworze glebowym do odpowiednich elektrod. Metodą elektrokinetyczną usuwane są z gleby przede wszystkim metale występujące w formie jonowej, jednak możliwe jest także usunięcie tlenków, wodorotlenków i węglanów metali (Vangronsveld,

Cunningham, 1998; Mulligan i współpr., 2001a i b; Sidoli O'Connor i współpr., 2003). Przemywanie gleby (ang. *soil washing*) związane jest z przepuszczaniem przez glebę roztworów, które przeprowadzają nierozpuszczalne formy metali do roztworu przemylającego. Najczęściej stosowanymi roztworami są: kwas siarkowy, solny lub kwasy organiczne, takie jak octowy i cytrynowy. Używano również związków chelatujących, głównie kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) lub kwasu nitrylotrioctowego (NTA). Bardzo często korzystano z mieszanin wcześniej wspomnianych związków, przy czym charakteryzowały się one niskim pH i wysokim stężeniem substancji użytych do przemylwania. Niewątpliwym plusem przemylwania gleby jest wysoka skuteczność tej metody w usuwaniu wielu metali ciężkich (Fristad i współpr., 1996; Ghestem, Bermond, 1998; Wasay i współpr., 1998; Vangronsveld, Cunningham, 1998; Mulligan i współpr., 2001a i b; Kos, Lešťan, 2004a). Najprostszym sposobem jest usunięcie wierzchniej, zanieczyszczonej warstwy gleby i przewiezienie jej na składowisko odpadów niebezpiecznych (ang. *excavation and landfilling*) (Vangronsveld, Cunningham, 1998). W miejsce usuniętej gleby często wprowadzana jest gleba o niskiej zawartości metali. Metodę usuwania zanieczyszczonej gleby stosowano wielokrotnie na terenie USA (Dushenkov i współpr., 1997a; Blaylock, 2000). Ostatnio zastosowano ją także na terenie Francji, gdzie, zdaniem autorów, okazała się jednak nieskuteczna (Douay i współpr., 2008).

Z przedstawionego opisu metod fizykochemicznych wynika jasno, że ich zastosowanie związane jest albo z usunięciem z danego miejsca (ekosystemu) zanieczyszczonej metalami ciężkimi gleby, albo z poddaniem jej procesom całkowicie zmieniającym jej strukturę i/lub właściwości biologiczne. W związku z tym konieczne okazało się opracowanie nowej, przyjaznej środowisku metody, pozwalającej na usunięcie metali z gleby lub ich przemianę w formy niedostępne bądź bardzo słabo dostępne organizmom żywym. Wydaje się, że metodą taką jest fitoremediacja.

1.3. Fitoremediacja jako metoda oczyszczania środowiska

Terminem fitoremediacja (ang. *phytoremediation*) definiowane jest użycie roślin wyższych w celu usunięcia zanieczyszczeń nieorganicznych lub organicznych ze środowiska bądź przekształcenia ich w formy nieszkodliwe dla organizmów żywych (Cunningham, Ow, 1996; Chaney i współpr., 1997; Flathman, Lanza, 1998; Salt i współpr., 1998). Metoda ta polega przede wszystkim na wykorzystaniu procesów fizjologicznych zachodzących

w roślinach i ryzosferze, jednak w celu ich usprawnienia w ostatnich latach znacząco wzrosła liczba badań nad zastosowaniem w fitoremediacji roślin modyfikowanych genetycznie (K ä r e n l a m p i i w s p ó ł p r . , 2000; G w ó ź d ź , K o p y r a , 2003; W a s i n k i e w i c z i w s p ó ł p r . , 2004; C h e r i a n , O l i v e i r a , 2005; P i l o n - S m i t s , 2005; G o r i n o v a i w s p ó ł p r . , 2007; B a r a b a s z i w s p ó ł p r . , 2008). Badania nad fitoremediacją prowadzone były intensywnie przez różne ośrodki naukowe od początku lat 90. XX wieku i dotyczyły różnych zanieczyszczeń (pierwiastków, związków) i podłoży. Obecnie wyróżnia się kilka metod fitoremediacji: fitodegradację, fitofiltrację, fitouwalnianie, fitochemostabilizację i fitoekstrakcję.

1.3.1. Metody fitoremediacji

1.3.1.1. Fitodegradacja

Fitodegradacja (ang. *phytodegradation*) jest metodą, która umożliwia usuwanie ze środowiska zbędnych lub toksycznych związków organicznych. Metoda ta polega na stosowaniu gatunków roślin mających zdolność pobierania związków organicznych, ich przekształcania w formy nietoksyczne lub o zmniejszonej toksyczności, a następnie ich odkładania w tkankach. Związki mogą być również odparowane przez szparki, a czasem nawet całkowicie rozkładane w roślinie do CO_2 , H_2O i Cl_2 (Cherian, Oliveira, 2005; Pilon-Smits, 2005). W przypadku związków, których pobieranie przez system korzeniowy jest utrudnione (np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne), rośliny stosowane w fitodegradacji powinny dodatkowo mieć zdolność wydzielania do ryzosfery enzymów rozkładających zanieczyszczenia bezpośrednio w glebie lub/i substancji stymulujących rozwój mikroorganizmów dokonujących detoksykacji (Cherian, Oliveira, 2005; Pilon-Smits, 2005). Niektórzy autorzy (Pilon-Smits, 2005 i cytowana tam literatura) traktują proces wydzielania przez rośliny związków stymulujących rozwój mikroorganizmów jako oddzielną metodę, zwaną fitostymulacją (ang. *phytostimulation*) lub ryzodegradacją (ang. *rhizodegradation*). Wydaje się jednak, że nieuzasadnione jest rozdzielanie procesów przeprowadzanych przez rośliny od procesów przeprowadzanych przez mikroorganizmy występujące w ryzosferze roślin. Z tego względu proponuje się stosowanie wyłącznie terminu fitodegradacja jako metody obejmującej zarówno rozkład związków organicznych przez samą roślinę, jak i przez mikroorganizmy występujące w obrębie jej

strefy korzeniowej. Cherian i Oliveira (2005) również proponują stosowanie wyłącznie terminu *phytodegradation*. Więcej informacji na temat możliwości zastosowania tej metody znajdzie czytelnik w pracach następujących autorów: Newman i Reynolds (2004), Wójcik i Tomaszewska (2005), Marecik i współpr. (2006), Gerhardt i współpr. (2009) oraz James i Strand (2009).

1.3.1.2. Fitofiltracja

Fitofiltracja (ang. *phytofiltration*) jest metodą polegającą na zastosowaniu roślin lub wysuszonej biomasy roślinnej do oczyszczania wód z różnych pierwiastków (Raskin i współpr., 1997). Jako biomasę stosuje się wysuszone całe rośliny (Gardea-Torresdey i współpr., 1998) lub tylko ich organy, jak na przykład pędy (Sawalha i współpr., 2009) czy liście (Sangi i współpr., 2008), a źródłem materiału roślinnego z reguły są rośliny lądowe (Gardea-Torresdey i współpr., 1998; Sangi i współpr., 2008; Sawalha i współpr., 2009). Roślinami, z których najczęściej korzysta się w fitofiltracji są rośliny wodne (np. *Elodea canadensis*, *Eichornia crassipes*), pobierające pierwiastki nie tylko korzeniami, ale również zanurzonymi w wodzie częściami pędów (Fritioff, Greger, 2007; Upadhyay, Tripathi, 2007). Do fitofiltracji należy także zaliczyć ryzofiltrację i szuwarowe oczyszczalnie ścieków.

Ryzofiltracja (ang. *rhizofiltration*) związana jest z wykorzystaniem systemów korzeniowych roślin, przede wszystkim do usuwania z zanieczyszczonych wód nadmiaru metali lub pierwiastków promieniotwórczych (Dushenkov i współpr., 1997a; Salt i współpr., 1998). Metoda ta związana jest ze stosowaniem głównie roślin lądowych, na przykład: słonecznika, gorczycy sarepskiej, tytoniu, szpinaku, kukurydzy lub fasoli (Dushenkov, Kapulnik, 2000; Lee, Yang, 2010). Ryzofiltracja polega na uprawie roślin w kulturach hydroponicznych, aż do uzyskania odpowiedniej biomasy. Następnie rośliny przenosi się do zbiorników zawierających zanieczyszczoną wodę i umieszcza w taki sposób, aby w kontakcie z roztworem pozostawały tylko korzenie. Proces oczyszczania sprowadza się głównie do pobierania, adsorpcji lub wytrącania na powierzchni korzeni metali lub pierwiastków promieniotwórczych. Znacznie mniejszą rolę odgrywa tu wytrącanie metali z roztworu w postaci osadu (Dushenkov i współpr., 1997a; Salt i współpr., 1998). Przeprowadzone do tej pory badania wykazały, że za pomocą ryzofiltracji można usunąć z wody takie metale, jak: Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn (Dushenkov i współpr., 1995; Salt i współpr., 1997). Uzyskano także dobre rezultaty w oczyszczaniu

wód z niemetalu, jak As (Huang i wspópr., 2004). Jednak dotychczas najbardziej zaawansowane są badania nad usuwaniem z wód pierwiastków radioaktywnych, między innymi: U, Ra, Cs lub Sr (Dushenkov i wspópr., 1997b; Tomé i wspópr., 2008; Lee, Yang, 2010). Za najbardziej odpowiednie gatunki do przeprowadzania ryzofiltracji uznano słonecznik i gorczycę sarepską, których zaletą jest wytwarzanie bardzo dużego systemu korzeniowego w kulturach wodnych (Raskin i wspópr., 1997; Dushenkov, Kapulnik, 2000). Wydaje się jednak, że istotny w ryzofiltracji może być stopień rozgałęzienia systemu korzeniowego, a nie jego masa, przynajmniej w przypadku Pb. Małkowski i wspópr. (2002), prowadząc badania w kulturach hydroponicznych, wykazali bowiem, że w korzeniach 4-dniowych siewek kukurydzy najintensywniejsza akumulacja Pb zachodzi w wierzchołkowej części tego organu. Tak więc silnie rozgałęziony system korzeniowy o mniejszej biomacie powinien kumulować więcej Pb niż słabo rozgałęziony system o większej biomacie (Małkowski i wspópr., 2002). Takie same wnioski wynikają z badań Meyersa i wspópr. (2008), prowadzonych z użyciem gorczycy sarepskiej.

Szuwarowe oczyszczalnie ścieków (ang. *constructed wetlands*) są sztucznie tworzonymi, płytkimi zbiornikami wodnymi, których przynajmniej 50% powierzchni porastają makrofity (Horne, 2000). Gatunkami roślin występującymi w takich oczyszczalniach są zarówno rośliny ziemno-wodne, na przykład: *Phragmites australis*, *Typha latifolia* czy *Shoenoplectus* spp. (Horn, 2000; Mayes i wspópr., 2009), jak i rośliny całkowicie zanurzone w wodzie (*Potamogeton* spp.) lub pływające po jej powierzchni (*Lemna* spp., *Eichornia crassipes*) (Horn, 2000; Jayaweera i wspópr., 2008). Do flory szuwarowych oczyszczalni zalicza się także duże glony, na przykład: *Chara* spp. i *Nitella* spp. (Horn, 2000). Oczyszczalnie te są tworzone przede wszystkim w celu usuwania azotu i fosforu ze ścieków bytowych lub rolniczych, a w mniejszym stopniu ze ścieków przemysłowych (Kern, Idler, 1999; Tanner i wspópr., 1999; Reinhardt i wspópr., 2005). Stosowane też były z powodzeniem do oczyszczania wód zawierających metale (Knox i wspópr., 2006; Yang i wspópr., 2006). W przypadku szuwarowych oczyszczalni ścieków, w odróżnieniu od ryzofiltracji, oprócz roślin, bardzo dużą rolę odgrywają mikroorganizmy oraz osad denny. Powstające w osadzie dennym warunki beztlenowe umożliwiają powstawanie siarczków, które z kolei powodują wytrącanie i immobilizację w osadach wielu metali. Uważa się, że w przypadku Cu i Pb warunki beztlenowe i tworzenie siarczków są najważniejszymi procesami decydującym o usuwaniu tych metali z wody w szuwarowych oczyszczalniach ścieków (Horn, 2000).

1.3.1.3. Fitoulatnianie

Fitoulatnianie (ang. *phytovolatilization*) to oczyszczanie gleb z lotnych związków organicznych (np. trichloroetylen) oraz trzech pierwiastków: Se, Hg i As (Raskin i współpr., 1997; Cherian, Oliveira, 2005; Pilon-Smits, 2005). Rośliny pobierają z gleby pierwiastek w rozpuszczalnej w wodzie postaci jonowej, a następnie przekształcają go w związki lotne, które w procesie transpiracji ulatniają się wraz z parą wodą (Cherian, Oliveira, 2005). Dotychczas najbardziej zaawansowane są badania nad fitoulatnianiem Se. Wiąże się to między innymi z występowaniem w przyrodzie gatunków roślin (jak *Astragalus bisulatus*) zdolnych do przeprowadzenia Se w formy lotne (metyloselenki) (Raskin i współpr., 1997). Jeśli chodzi o Hg i As, to rośliny wykazują niewielką zdolność do przekształcania tych pierwiastków w formy lotne (Cherian, Oliveira, 2005). Udało się jednak uzyskać rośliny transgeniczne (rzodkiewnik, tytoń, rzepak) z wbudowanymi genami bakteryjnymi (*merA* i/lub *merB*), których produkty przekształcają rtęć lub metylortęć w Hg^0 , sublimującą i ulatniającą się z rośliny wraz z wytranspirowaną wodą (Meagher i współpr., 2000). W języku polskim pojawiło się kilka terminów (fitowolatilizacja, fitoewaporacja, fitoodparowanie) nazywających tę metodę fitoremediacji. Spośród nich tylko pojęcie „fitoodparowanie” (Karczewska, 2003; Marecik i współpr., 2006) jest terminem prawidłowo oddającym sens metody i powinien być stosowany jako synonim fitoulatniania. W pozostałych nazwach użyto albo niepoprawnego dla języka polskiego terminu wolatilizacja, albo ściśle zdefiniowanego słowa ewaporacja, określającego parowanie z powierzchni gleby lub zbiorników wodnych, a więc nieoddającego w sposób prawidłowy istoty metody fitoulatniania.

1.3.1.4. Fitochemostabilizacja

W porównaniu z omówionymi wcześniej metodami fitoremediacji, fitochemostabilizacja jest techniką o wiele dokładniej przebadaną, zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i polowych. Fitochemostabilizacja (ang. *chemophytostabilization*, *phytostabilization*) to metoda, której zadaniem jest immobilizacja metali w glebach za pomocą roślin i wprowadzanych do gleby dodatków (Vangronsveld, Cunningham, 1998; Knox i współpr., 2000a).

W języku angielskim funkcjonuje kilka terminów określających fitochemostabilizację. Najczęściej używany to „fitostabilizacja” (ang. *phytostabilization*) (Cunningham i współpr., 1995; Chaney i współpr., 1997; Raskin

i współpr., 1997; Berti, Cunningham, 2000; Cherian, Oliveira, 2005). Innymi stosowanymi w tym celu pojęciami są: *phytorestation*, *in-place inactivation*, *in situ stabilization* lub *chemophytostabilization* (Van Gronsveld, Cunningham, 1998; Berti i współpr., 1998; Knox i współpr., 2000a i b). Termin fitostabilizacja sugeruje, że jedynym czynnikiem decydującym o immobilizacji metali w glebie są rośliny. Tymczasem analiza dostępnej literatury wskazuje na jednoczesne działanie roślin i dodatków wprowadzanych do gleby. Tak więc nie tylko udział roślin (fito), ale również związków chemicznych (chemo) jest niezbędny, aby uzyskać pełną i trwałą stabilizację metali w glebie. Z tego względu wprowadzony po raz pierwszy przez Knox i współpr. (2000a) termin *chemophytostabilization*, wydaje się najlepiej oddawać sens metody. Biorąc jednak pod uwagę, że metoda ta polega na wytworzeniu trwałej i zwartej pokrywy roślinnej, a wzrost bioróżnorodności jest ostatecznym celem, proponuje się stosowanie terminu fitochemostabilizacja (ang. *phytochemostabilization*).

Wprowadzanie do gleby dodatków (ang. *amendments*) w procesie fitochemostabilizacji ma na celu przekształcenie form jonowych i łatwo rozpuszczalnych związków metali w formy słabo lub bardzo słabo rozpuszczalne. Dochodzi do tego w wyniku: (1) sorpcji metali, (2) wytrącania metali z roztworu, (3) zmiany stopnia utlenienia metali, (4) humifikacji. Wszystkie te procesy prowadzą do ograniczenia biodostępności metali. W efekcie uzyskuje się zmniejszenie ługowania i pobierania metali przez rośliny, mikroorganizmy, jak również bezkręgowce i kręgowce (Van Gronsveld, Cunningham, 1998). Ponadto zakłada się, że dodatki, poza skuteczną immobilizacją metali, powinny być: (1) łatwe do transportu, (2) tanie, (3) bezpieczne dla pracowników w trakcie rozprowadzania, (4) nietoksyczne dla roślin lub nawet stymulujące ich wzrost, (5) bez ujemnego wpływu na żadne elementy środowiska poddawanego fitochemostabilizacji, (6) łatwe do pozyskania lub produkcji (Berti, Cunningham, 2000).

Zadaniem roślin stosowanych w fitochemostabilizacji jest zabezpieczenie powierzchni zanieczyszczonej gleby przed erozją wodną i wietrzną, ograniczenie liczby odcieków powstających po opadach deszczy i ługowania metali oraz migracji cząstek glebowych zanieczyszczonych metalami. Jest to możliwe tylko wtedy, gdy rośliny mogą wytworzyć zwartą okrywę i głęboki, silnie rozgałęziony system korzeniowy. Powinny się również charakteryzować wysoką tolerancją w stosunku do różnych metali ciężkich, intensywną transpiracją, wysoką akumulacją metali w korzeniach, przy równocześnie niskiej akumulacji w pędach (Van Gronsveld, Cunningham, 1998; Berti, Cunningham, 2000). Nie bez znaczenia jest także zdolność roślin do stymulacji rozwoju mikroorganizmów (bakterii, grzybów) żyjących w obrębie ryzosfery i przyspieszających proces fitochemostabilizacji (Van Gronsveld, Cunningham, 1998).

Metoda ta powinna być stosowana przede wszystkim w przypadku gleb silnie zanieczyszczonych metalami, a więc na terenach w bezpośrednim sąsiedztwie zwałowisk, hut i/lub kopalń metali nieżelaznych, gdzie posługiwanie się innymi metodami fitoremediacji byłoby niemożliwe lub bardzo utrudnione, ze względu na toksyczne działanie metali zawartych w glebie na wzrost i rozwój roślin (Van gronsveld, Cunningham, 1998; Brown i wspólr., 2004; Kucharski i wspólr., 2005). Zakłada się także możliwość korzystania z niej w przypadku gleb uprawnych, średnio lub słabo zanieczyszczonych, w celu ograniczenia akumulacji metali w roślinach uprawnych (Chlopecka, Adriano, 1997; Van gronsveld, Cunningham, 1998).

Proces fitochemostabilizacji rozpoczyna się od wprowadzenia do gleby dodatków i ich wymieszania z górną, najbardziej zanieczyszczoną metalami warstwą gleby. Po 2–6 tygodniach wysiewa się rośliny lub pozostawia teren nieobsiany, czekając aż obniżona, w wyniku działania dodatków, biodostępność metali umożliwi wzrost lokalnym, odpornym ekotypom roślin. Dotychczas jako dodatków najczęściej używano związków fosforu, tlenków żelaza i manganu lub produktów odpadowych zawierających Fe i Mn, glinokrzemianów, gipsu, materii organicznej lub substancji alkalizujących (Berti, Cunningham, 2000; Van gronsveld, Cunningham, 1998; Knox i wspólr., 2000a i b; Laperche, 2000; Mench i wspólr., 2000; Ciećko i wspólr., 2001).

Bardzo wiele uwagi w badaniach nad fitochemostabilizacją poświęcono związkom fosforu. Jako dodatek fosfor stosowano w postaci: H_3PO_4 , fosforanów, apatytów, fosforytów, tomasyny (ang. *Thomas basic slag*), nawozów fosforowych lub nawozów zawierających NPK (Mench i wspólr., 2000; Laperche, 2000; Shu i wspólr., 2002; Theodoratos i wspólr., 2002; Knox i wspólr., 2003; Brown i wspólr., 2004; Schreckel, Ryan, 2004; Kucharski i wspólr., 2005; Panfili i wspólr., 2005; Misra, Chaturvedi, 2007).

Badania wykazały wysoką skuteczność związków fosforu w immobilizacji zarówno Pb, jak również Cd i Zn. Stwierdzono, że zastosowanie nawozów fosforowych w postaci $(NH_4)_2HPO_4$ (McGowen i wspólr., 2001) lub superfosfatu potrójnego, składającego się głównie z $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ (Brown i wspólr., 2004; Kucharski i wspólr. 2005), w istotny sposób obniżało akumulację wymienionych pierwiastków w roślinach. Efekt zmniejszonej akumulacji w roślinach, a także obniżonej biodostępności Pb, Cd i Zn uzyskano również po wprowadzeniu do gleby apatytów lub fosforytów (Laperche, 2000; Knox i wspólr., 2003; Brown i wspólr., 2004; Schreckel, Ryan, 2004). Wyrażne obniżenie biodostępności i akumulacji w roślinach Pb, Cd i Zn zaobserwowano także po wprowadzeniu do gleby H_3PO_4 (Brown i wspólr., 2004; Schreckel, Ryan, 2004; Geebelen i wspólr., 2006). Biorąc jednak pod uwagę wymienione wcześniej cechy, jakie powinny

charakteryzować dodatki (Berti, Cunningham, 2000), stosowanie silnego kwasu nieorganicznego, nawet w niskich stężeniach, jest niekorzystne.

Jakkolwiek związki fosforu okazały się bardzo skuteczne w immobilizacji Pb, Cd i Zn, to jednak muszą być stosowane z dużą ostrożnością na glebach zanieczyszczonych w wyniku działalności hutnictwa oraz górnictwa cynku i ołowiu. Gleby takie zawierają bowiem podwyższone zawartości nie tylko trzech wspomnianych metali, ale także As (Cabała, Teper, 2007). Ponieważ P i As tworzą aniony o podobnych właściwościach (Kabata-Pendias, Pendias, 2001), wprowadzenie fosforu do gleb zawierających As zawsze prowadzi do spadku pH i uwalniania As do roztworu glebowego, a w konsekwencji do zwiększenia biodostępności tego metaloidu (Theodoratos i współpr., 2002). Nowsze badania wykazały jednak, że podanie wapna nawozowego wraz z superfosfatem potrójnym silnie ogranicza uruchamianie As przez P, równocześnie nie zmniejszając immobilizacji Pb i Cd (Małkowski i współpr., 2003). Z wprowadzaniem do gleby łatwo rozpuszczalnych związków fosforu związane są także inne niebezpieczeństwa. W przypadku zastosowania nadmiernych ilości P możliwa jest migracja jonów fosforanowych do wód podziemnych, lub nawet poza dany ekosystem, jak również unieruchamianie mikroelementów (np. Cu, Fe), co może prowadzić do ograniczenia wzrostu roślin. Niezbędne jest więc monitorowanie stanowisk, na których przeprowadza się fitochemostabilizację z użyciem związków fosforu.

Dotychczas przeprowadzone eksperymenty potwierdziły także znaczną skuteczność uwodnionych tlenków (ang. *oxyhydroxides* lub *hydrous oxides*) żelaza i/lub manganu w procesie immobilizacji metali (Brown i współpr., 2004; Aboulroos i współpr., 2006). Uwodnione tlenki obu metali wykazują bowiem zdolność do silnej sorpcji (Berti, Cunningham, 2000) różnych pierwiastków, a nawet włączania ich w swą strukturę, co stwierdzono w przypadku Pb (Berti i współpr., 1998). Budowa, właściwości i działanie uwodnionych tlenków Fe i Mn w procesie fitochemostabilizacji zostały szczegółowo opisane przez Menchai i współpr. (2000).

Oprócz tlenków Fe i Mn, dużo uwagi poświęcono badaniom nad skutecznością w procesie fitochemostabilizacji glinokrzemianów (ang. *aluminosilicates*), takich jak minerały ilaste, zeolity lub beringit (Menchai i współpr., 2000), ponieważ substancje te charakteryzują się wysoką pojemnością sorpcyjną w stosunku do różnych kationów (Gliński, 1999). Lothenbach i współpr. (1998) oraz Badora i współpr. (1998) wykazali, że wprowadzenie zmodyfikowanego montmorylonitu do zanieczyszczonej metalami gleby obniżało stężenie biodostępnych form Cd, Zn i Cu, ale nie obniżało mobilności Pb. Inny z minerałów ilastych (pałygorskit) okazał się skuteczny nie tylko w immobilizacji Cd, Cu i Zn, ale również Pb w glebie zanieczyszczonej w wyniku działalności kopalni rud cynku i ołowiu (Alvarez-Ayuso, Garcia-Sanchez, 2003). Szczególnie dużo prób immobilizacji metali w glebach prowadzono

z zeolitami naturalnymi i sztucznymi, wykazując ich skuteczność zarówno w przypadku ograniczania biodostępności Pb (G w o r e k, 1992), Cd (G w o r e k i współpr., 1998; K e l l e r i współpr., 2005b), jak i w wypadku równoczesnej immobilizacji Pb, Cd, Zn i Cu (G w o r e k i współpr., 1996; K n o x i współpr., 2003; M a d r i d i współpr., 2006; S z á k o v á i współpr., 2007). Interesujący sposób zastosowania zeolitów do immobilizacji metali w glebach lub oczyszczania gleb z metali zaproponowali polscy naukowcy (G w o r e k i współpr., 2004). Polega on na wytwarzaniu z zeolitów brykietów (tzw. brykietów BAG), które po wprowadzeniu do gleby oddają do roztworu glebowego jony wapnia i/lub potasu, wiążąc wymiennie jony metali ciężkich. Usunięcie brykietów z gleby pozbawia ją metali toksycznych, równocześnie wzbogacając w wapń i potas (G w o r e k i współpr., 2004).

Beringit jest glinokrzemianem, którego wytwarzanie zostało zakończone w 1997 roku (L o c k, J a n s s e n, 2003). Niemniej jednak badania nad jego zastosowaniem w fitochemostabilizacji wciąż trwają. Po raz pierwszy w badaniach polowych znalazł zastosowanie w Belgii (Maatheide), na terenach wokół huty metali nieżelaznych, dając bardzo dobre efekty (V a n g r o n s v e l d i współpr., 1995, 1996). Dużą jego skuteczność w immobilizacji metali potwierdziły także dalsze badania, zarówno laboratoryjne, jak i polowe (L o m b i i współpr., 2002; M e n c h i współpr., 2003 i 2006b).

Bardzo istotnym, a jednocześnie wciąż słabo zbadanym problemem jest wpływ dodatków glebowych, wprowadzanych w czasie fitochemostabilizacji, na funkcjonowanie mikroorganizmów. Pierwsze doniesienia o pozytywnym wpływie dodatków na mikoryzę arbuskularną znane są już od 1996 roku (V a n g r o n s v e l d i współpr., 1996). Jednak dopiero badania ostatnich lat wykazały, że dodatki stymulują nie tylko wzrost roślin, ale również aktywność enzymów glebowych oraz wzrost bakterii i grzybów mikoryzowych. M e n c h i współpr. (2006a) w glebie zanieczyszczonej Cd i Ni zaobserwowali wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej i kwaśnej, β -glukozydazy oraz proteaz. K u m p i e n e i współpr. (2009) także stwierdzili w glebie zawierającej podwyższone stężenia Pb i Cu wyższą aktywność wspomnianych enzymów, a ponadto wzrost biomasy mikroorganizmów oraz oddychania glebowego. Z kolei G u c w a - P r z e p i ó r a i współpr. (2007) wykazali wielokrotny wzrost kolonizacji korzeni *Deschampsia caespitosa* przez mikoryzę arbuskularną w warstwie gleby, do której wprowadzono dodatki wspomagające fitochemostabilizację.

1.3.1.5. Fitoekstrakcja

Fitoekstrakcja (ang. *phytoextraction*) jest metodą polegającą na wykorzystaniu roślin wyższych do oczyszczania gleb z metali ciężkich, pierwiastków promieniotwórczych lub związków organicznych, przez pobieranie ich z gleby i akumulację w tkankach, które następnie są usuwane wraz z zanieczyszczeniami. Odkładanie toksycznych pierwiastków lub związków powinno zachodzić przede wszystkim w pędach, a więc częściach łatwo dających się usunąć w całości z pola, w odróżnieniu od korzeni (Salt i współpr., 1998).

Fitoekstrakcję metali można podzielić na fitoekstrakcję ciągłą (ang. *continuous phytoextraction*) i fitoekstrakcję indukowaną (ang. *induced phytoextraction*), ze względu na różnice w mechanizmach procesów oraz w stosowanych w tych procesach gatunkach roślin (Salt i współpr., 1998; Garbisu, Alkorta, 2001).

Fitoekstrakcja ciągła polega na wysianiu na zanieczyszczonej glebie gatunków roślin charakteryzujących się odpornością na toksyczne działanie wysokich zawartości metali oraz zdolnością do ich akumulacji, przede wszystkim w pędach. W trakcie wzrostu i przyrostu biomasy ilość akumulowanych metali w częściach nadziemnych zwiększa się w sposób ciągły. Rośliny takie uprawia się do uzyskania jak największej biomasy pędów, a następnie są one usuwane wraz z zanieczyszczeniami. Takimi właściwościami charakteryzują się specyficzne gatunki roślin określane terminem „hyperakumulatory”. Aktualnie funkcjonują dwie definicje hyperakumulatorów. Według pierwszej z nich, do hyperakumulatorów zalicza się gatunki roślin, w których stężenia metali w dowolnym organie lub tkance części nadziemnych przekraczają określone wartości. Definicja ta dotyczy tylko okazów zebranych w ich naturalnych środowiskach. Zawartości akumulowanych metali muszą być przynajmniej o jeden rząd wielkości wyższe od spotykanych w roślinach niebędących hyperakumulatorami i rosnących na tym samym terenie (Baker i współpr., 2000; Reeves, Baker, 2000). Określono minimalny poziom pierwiastków, który decyduje o zaliczeniu danego gatunku do hyperakumulatorów. W przypadku Pb i Cu przyjęto 1 000 mg, dla Cd 100 mg, a dla Zn 10 000 mg/kg s.m. organów nadziemnych (Baker i współpr., 2000). Zgodnie z drugą definicją, roślinę uznaje się za hyperakumulator, jeśli stosunek zawartości danego metalu w pędzie i korzeniu jest równy lub większy od 1 (Salt, Krämer, 2000). Ta definicja uwzględnia właściwości fizjologiczne rośliny, w szczególności zdolność do bardzo sprawnego transportu metali z korzeni do pędów i wysoką odporność na metale komórek w częściach nadziemnych. Jednocześnie nie jest oparta na wybranych arbitralnie zawartościach metali w pędach, decydujących o zaliczeniu gatunku do hyperakumulatorów. Właśnie tę definicję hyperakumultora przyjęto w niniejszej pracy.

W przyrodzie występuje najwięcej gatunków roślin hyperakumulujących Ni. Reeves i Baker (2000) podają aż 318 taksonów roślin będących hyperakumulatorami tego metalu. Dla porównania, do hyperakumulatorów Zn i Cd zalicza się tylko 11 (McGrath i wspólr., 2002) lub 13 taksonów (Reeves, Baker, 2000), a do hyperakumulatorów Pb 14 taksonów (Reeves, Baker, 2000). Należy jednak zwrócić uwagę, że zdolność roślin do hyperakumulacji Pb jest wątpliwa. Wskazują na to badania przeprowadzone w kulturach hydroponicznych oraz badania wazonowe z glebą ze stanowisk zanieczyszczonych w wyniku działalności hutnictwa metali nieżelaznych. Badania te wykazały znacznie wyższe stężenia Pb w korzeniach niż w pędach trzech gatunków tobołków uznawanych za hyperakumulatory Pb: *Thlaspi caerulescens* i *Thlaspi rotundifolium* (Huang, Cunningham, 1996; McGrath i wspólr., 2002) oraz *Thlaspi praecox* (Vogel-Mikuš i wspólr., 2006). Również badania przeprowadzone z *Sesbania drummondii*, uznanym przez Sahi i wspólr. (2002) za hyperakumulator Pb, nie potwierdziły zdolności tego gatunku do hyperakumulacji. W przypadku tego gatunku stwierdzono bowiem o wiele wyższą akumulację Pb w korzeniach w porównaniu z pędami, zarówno w eksperymentach przeprowadzonych w kulturach hydroponicznych (Sahi i wspólr., 2002), jak i w badaniach z glebą sztucznie zanieczyszczoną $Pb(NO_3)_2$ (Ruley i wspólr., 2006).

Spośród kilkunastu taksonów zaliczanych do hyperakumulatorów Cd i Zn najwięcej uwagi poświęcono 2 gatunkom: *Thlaspi caerulescens* i *Arabidopsis halleri*. Badania wykazały, że oba, zarówno w kulturach hydroponicznych, jak i w uprawie na zanieczyszczonej glebie, wykazują takie same lub wyższe zawartości Zn i Cd w pędach w porównaniu z korzeniami, co pozwala zaliczyć je do hyperakumulatorów Cd i Zn (Lasat i wspólr., 1996; Shen i wspólr., 1997; Küpper i wspólr., 2000; Sarret i wspólr., 2002; Assunção i wspólr., 2003; Fischerová i wspólr., 2006).

Pierwsze polowe eksperymenty, badające możliwości wykorzystania hyperakumulatorów do oczyszczania gleb z metali, przeprowadzono już w latach 1991—1993 w Rothamsted Experimental Station w Wielkiej Brytanii (McGrath i wspólr., 2002 i cytowana tam literatura). Wykonano je z użyciem 7 gatunków hyperakumulatorów na glebach słabo lub umiarkowanie zanieczyszczonych Cd i Zn w wyniku nawożenia osadami ściekowymi i zawierających maksymalnie 444 mg Zn i 13,6 mg Cd na kg gleby. Spośród przebadanych gatunków najbardziej obiecującymi w ekstrakcji Cd i Zn z gleb okazały się wspomniane wcześniej *Thlaspi caerulescens* i *Arabidopsis halleri* (McGrath i wspólr., 2000). Wymienieni autorzy stwierdzili jednak, że oba gatunki tych dziko rosnących roślin nie są łatwe w uprawie, a uzyskane plony części nadziemnych są bardzo zróżnicowane i stosunkowo niskie. Określili więc dalsze kierunki badań mających na celu: (1) wyselekcjonowanie genotypów najbardziej nadających się do prowadzenia fitoekstrakcji ciągłej i rozpoczęcie produk-

cji nasion; (2) określenie mechanizmów odpowiedzialnych za hyperakumulację Cd i Zn; (3) ustalenie mechanizmów tolerancji na metale; (4) wyizolowanie genów odpowiedzialnych za hyperakumulację i tolerancję na metale (McGrath i współpr., 2002). Wnioski te stały się podstawą do dalszych eksperymentów prowadzonych przez różne ośrodki naukowe na całym świecie. Część z nich koncentrowała się na samej fitoekstrakcji ciągłej, natomiast część na wykryciu genów odpowiedzialnych za wspomniane wcześniej mechanizmy odporności i wysokiej akumulacji metali w pędach.

Badania dotyczące zmienności wewnątrzpopulacyjnej związanej z hyperakumulacją Zn i Cd potwierdziły wyjątkową zdolność *T. caerulescens* i *A. halleri* do pobierania i akumulacji obu metali w pędach (Reeves i współpr., 2001; Bert i współpr., 2002; Macnair, 2002; Schwartz i współpr., 2006). Jednak pierwsze eksperymenty fitoekstrakcji ciągłej, przeprowadzone przez naukowców spoza Rothamsted Experimental Station, wskazywały na mniejszą wydajność *T. caerulescens* w fitoekstrakcji Zn z gleby w porównaniu z *Brassica juncea*. Natomiast w przypadku Cd wydajność obu gatunków była podobna (Ebbes i współpr., 1997). Ta niższa efektywność fitoekstrakcji, czyli mniejsza ilość Zn usuwanego z gleby wraz z pędami *T. caerulescens*, była spowodowana 10-krotnie niższą jego biomasą w porównaniu z biomasą *Brassica juncea* (Ebbes i współpr., 1997). Późniejsze badania dowiodły jednak, że oba hyperakumulatory charakteryzują się wyższą wydajnością w fitoekstrakcji Cd i Zn w porównaniu z wieloma gatunkami roślin uprawnych, jak: *Brassica juncea*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays* czy *Lactuca sativa* oraz z krzewami z rodzaju *Salix* (Keller i współpr., 2003; Schwartz i współpr., 2003; Fische-rová i współpr., 2006; Hammer i współpr., 2006). Mimo wysokiej zdolności do ekstrakcji Cd i Zn z gleb, *T. caerulescens* i *A. halleri* cechuje kilka właściwości, które ograniczają ich przydatność do tego procesu. Do takich niepożądanych cech należy zaliczyć powolny wzrost i niewielkie rozmiary, czego efektem jest wytwarzanie niewielkiej biomasy (Blaylock, Huang, 2000; Krämer, 2005), a także rozetowy pokrój, który utrudnia zbiór roślin (McGrath i współpr., 2002). Poza tym hyperakumulatory charakteryzują się wybiórczą zdolnością akumulacji Cd i Zn (Verbruggen i współpr., 2009), podczas gdy gleby zanieczyszczone przez przemysł metali nieżelaznych zawsze zawierają duże ilości Cd, Zn i Pb (Brej, 1998; Kucharski i współpr., 2005; Karczewska i współpr., 2006; Gucwa-Przepióra i współpr., 2007; Cabała, Teper, 2007). Niewiele też wiadomo o ich wymaganiach uprawowych, wrażliwości na szkodniki, choroby bakteryjne i grzybowe oraz metodach ich zwalczania. Zaproponowano więc opracowanie takich metod uprawy gleby i roślin, które powinny zaowocować znacznie większym plonem, korzystnym dla efektywności fitoekstrakcji ciągłej (Chaney i współpr., 2000). Pierwsze próby, z zastosowaniem nawożenia, wykazały pozytywny wpływ na przyrost biomasy *T. caerulescens*, a także na zdolność tego

hyperakumulatora do fitoekstrakcji Zn i Cd (Bennett i współpracownicy, 1998; Keller i współpracownicy, 2003; Schwartz i współpracownicy, 2003; Sirguy i współpracownicy, 2006; Monsanto i współpracownicy, 2008; Xie i współpracownicy, 2009). Mimo takich wyników, wielu autorów nadal uważa, że użycie *T. caerulescens* do fitoekstrakcji na skalę polową byłoby niepraktyczne ze względu na inne, wcześniej wspomniane, przyczyny (Blaylock, Huang, 2000; Gishbert i współpracownicy, 2003; Krämer, 2005). Z tego powodu większość badań przeprowadzona w ciągu ostatnich lat koncentrowała się na molekularnych mechanizmach hyperakumulacji i odporności, a nie na ocenie efektywności fitoekstrakcji ciągłej (Małkowski, Kurtyka, 2003; Krämer, 2005; Chiang i współpracownicy, 2006; Barabasz i współpracownicy, 2008; Verbruggen i współpracownicy, 2009). Celem tych badań molekularnych było znalezienie genów odpowiedzialnych za wspomniane mechanizmy i uzyskanie genetycznie modyfikowanych organizmów roślinnych, które wytwarzałyby dużą biomasę oraz charakteryzowały się wysoką odpornością na metale i zdolnością do ich hyperakumulacji (Krämer, 2005). Uzyskanie takich roślin mogłoby znacznie zwiększyć efektywność fitoekstrakcji ciągłej.

Pierwsze doniesienia wskazywały na wyraźny wzrost akumulacji różnych metali, w tym także Pb i Cd, w roślinach genetycznie modyfikowanych. Grichko i współpracownicy (2000) wykazali to na przykładzie transgenicznego pomidora z wbudowanym bakteryjnym genem deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (deaminaza ACC), który to enzym obniża stężenie etylenu w roślinach i tym samym zwiększa ich odporność na działanie różnych czynników stresowych. Wspomniani autorzy stwierdzili, w najbardziej efektywnej linii roślin, 5-krotnie wyższe stężenie Cd w porównaniu z kontrolą. Jednak ponad 90% tego metalu akumulowały korzenie, co praktycznie uniemożliwiało zastosowanie tej rośliny w fitoekstrakcji. Natomiast koncentracja Pb w częściach nadziemnych była niemal 3-krotnie wyższa niż w kontroli i, w odróżnieniu od Cd, prawie 60% tego metalu gromadziło się w pędach. Trudno jednak określić rzeczywistą przydatność tych transgenicznych linii do fitoekstrakcji obu pierwiastków, ponieważ badania były prowadzone w uprawach na glebie sztucznie zanieczyszczonej wprowadzeniem dobrze rozpuszczalnych związków obu metali. Ponadto w pracy nie podano żadnych informacji na temat właściwości gleby (Grichko i współpracownicy, 2000), na przykład pH lub przewodnictwa elektrycznego, które w rzeczywistych warunkach mogą wpływać na biodostępność metali i ich akumulację w roślinach. Późniejsze badania tego zespołu wykazały (Farwell i współpracownicy, 2006), że w przypadku transgenicznego *Brassica napus* z wbudowanym genem deaminazy ACC rośliny modyfikowane wytwarzały większą biomasę, ale charakteryzowały się niższą akumulacją Ni w pędach w porównaniu z kontrolą. W efekcie ilość ekstrahowanego Ni była taka sama w przypadku roślin kontrolnych i transgenicznych. Natomiast zwiększoną akumulację Ni autorzy zaobserwowali zarówno w roślinach kontrolnych,

jak i transgenicznych, inokulowanych szczepem bakterii *Pseudomonas putida* (Farwell i współpr., 2006). W rezultacie więc lepszą efektywnością fitoekstrakcji charakteryzowała się inokulowana bakteria forma wyjściowa niż rośliny modyfikowane genetycznie.

Znacznie więcej eksperymentów przeprowadzono z roślinami transgenizowanymi genami innego gatunku rośliny. W badaniach tych najczęściej korzystano z genu kodującego syntazę fitochelatynową lub innych genów związanych z syntezą fitochelatyn, aby otrzymać rośliny bardziej tolerancyjne na metale i charakteryzujące się większą akumulacją metali w pędach. Uzyskano jednak bardzo niejednoznaczne wyniki. Niektórzy z autorów wykazali bowiem brak zwiększonej tolerancji i akumulacji metali w pędach roślin (Lee i współpr., 2003a i b), inni opisywali zwiększoną odporność, przy równoczesnym braku wzmożonej akumulacji w pędach (Pomponi i współpr., 2006; Wawrzyński i współpr., 2006; Gasic, Korban, 2007) lub stwierdzali wzrost zarówno tolerancji, jak i akumulacji metali (Gisbert i współpr., 2003; Martinez i współpr., 2006). Rozbieżności w otrzymanych wynikach mogły być związane z różnym pochodzeniem transgenów, co potwierdzili Wojas i współpr. (2008), uzyskując linie *Nicotiana tabacum* z wbudowanym genem syntazy fitochelatynowej (*AtPCS1*) z *Arabidopsis thaliana* oraz linie z genem syntazy fitochelatynowej (*CePCS*) z nicienia *Caenorhabditis elegans*. Reakcja obu linii *N. tabacum* na Cd była różna i zależna od pochodzenia genu. W obu przypadkach jednak nie stwierdzono zwiększonej akumulacji Cd w pędach roślin transgenicznych w porównaniu z formą wyjściową (Wojas i współpr., 2008).

Gisbert i współpr. (2003) oraz Martinez i współpr. (2006), wprowadzając gen syntazy fitochelatynowej z pszenicy (*TaPCS1*) do *Nicotiana glauca*, uzyskali rośliny bardziej odporne na Pb i Cd oraz akumulujące oba metale w wyższych stężeniach w stosunku do roślin kontrolnych. Bliższa analiza danych wskazuje jednak, że rośliny transgeniczne, podobnie jak forma wyjściowa, akumulowały Pb przede wszystkim w korzeniach (Martinez i współpr., 2006). Zawartości Pb i Cd w pędach roślin były niskie w porównaniu z koncentracją tych metali w glebie (Martinez i współpr., 2006), co nie wskazywało na zwiększenie zdolności roślin do fitoekstrakcji Pb i Cd przez modyfikacje genetyczne.

Bardzo ciekawe badania przeprowadzono z użyciem roślin transgenicznych z wprowadzonym genem *TaLCT1* niezwiązanym z tolerancją na metale, ale z transportem jonów metali do komórek. Clements i współpr. (1998) wykazali, że gen ten jest odpowiedzialny za syntezę systemu transportującego LCT1, przenoszącego Ca i Cd do komórek drożdży. Transgeniczne rośliny z wbudowanym genem *TaLCT1* powinny charakteryzować się zwiększoną akumulacją Cd i Pb. Antosiewicz i Hennig (2004) oraz Wojas i współpr. (2007) uzyskali linie *Nicotiana tabacum*, wykazujące nadekspresję wspomnianego

genu. W przypadku roślin transgenicznych zaobserwowali jednak mniejszą akumulację Cd i Pb w pędach w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Przedstawione dane sugerują więc, że fitoekstrakcja ciągła w skali polowej, z udziałem hyperakumulatorów, byłaby aktualnie bardzo utrudniona. Przyczyną jest brak danych dotyczących metod uprawy i zbioru, a także niedopracowanie metod selekcji najbardziej użytecznych ekotypów i ich uprawy w celu uzyskania odpowiedniej ilości nasion. Wyniki dotychczasowych eksperymentów z roślinami transgenicznymi, chociaż obiecujące, także nie pozwalają na szybkie ich zastosowanie w fitoekstrakcji ciągłej w warunkach polowych. Obecnie prowadzi się jednak coraz więcej badań, szczególnie z roślinami modyfikowanymi genetycznie, które pozwolą na dalszy rozwój tej metody fitoremediacji i umożliwią jej zastosowanie w skali polowej.

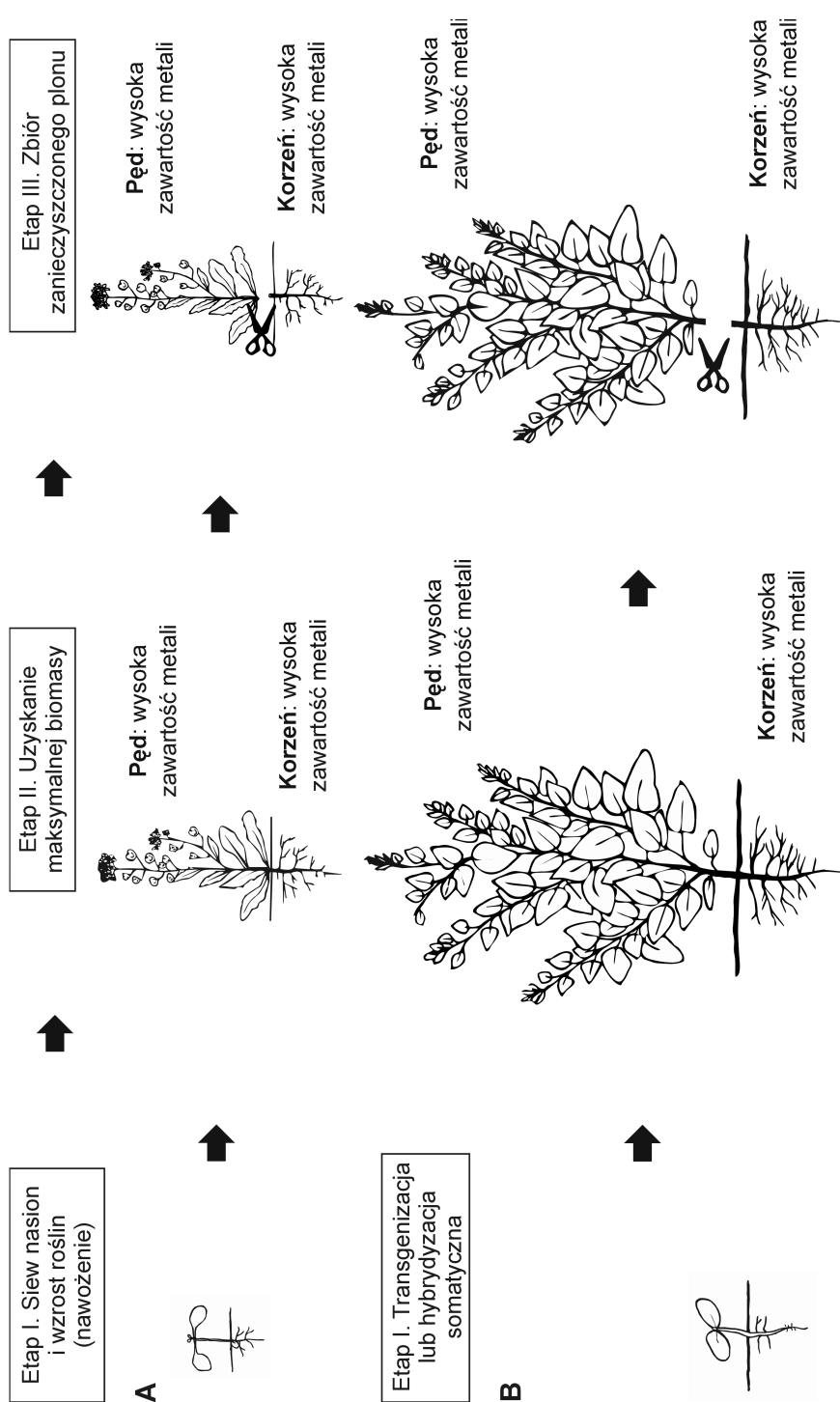
Przebieg w warunkach polowych fitoekstrakcji ciągłej z zastosowaniem hyperakumulatorów schematycznie można przedstawić w następujący sposób (rys. 1A):

1. Wysiew nasion bezpośrednio do gleby zanieczyszczonej w różnym stopniu metalami. Wzrost biomasy hyperakumulatorów można stymulować odpowiednim nawożeniem.
2. Wzrost roślin bez objawów toksycznego działania metali oraz ciągła akumulacja metali w korzeniach i pędach.
3. Po uzyskaniu maksymalnej biomasy usuwanie toksycznego plonu pędów.

W przypadku roślin modyfikowanych przebieg fitoekstrakcji ciągłej jest bardzo podobny. Jej efektywność można zwiększyć zastosowaniem roślin modyfikowanych genetycznie lub hybryd somatycznych wytwarzających dużą biomasę, a równocześnie wykazujących odporność na metale oraz zdolność do wysokiej akumulacji metali w pędach (rys. 1B).

Fitoekstrakcja indukowana, w odróżnieniu od fitoekstrakcji ciągłej, polega na użyciu roślin, głównie uprawnych, wytwarzających dużą biomasę, takich jak: gorczyca sarepska (*Brassica juncea*), słonecznik zwyczajny (*Helianthus annuus*) lub kukurydza zwyczajna (*Zea mays*) (Salt i współpr., 1998). Dobra znajomość uprawy i zbioru wymienionych gatunków, jak również łatwy dostęp do materiału siewnego ułatwiają prowadzenie tego typu fitoekstrakcji. Jednak wymienione rośliny w czasie wzrostu akumulują metale (Pb i Cd) przede wszystkim w korzeniach (Antosiewicz, 1993; Florijn, Van Beusichem, 1993; Chen, Cutright, 2002; Małkowski i współpr., 2002; Piechalak i współpr., 2002; Gadapati, Macfie, 2006; Šimonová i współpr., 2007; Kurtyka i współpr., 2008).

Aby można je stosować w fitoekstrakcji, konieczne jest więc stworzenie takich warunków, w wyniku których zawartość obu wymienionych metali w pędach byłaby wyższa lub taka sama, jak ich zawartość w korzeniach. Dotychczasowe badania wykazały, że taki efekt można otrzymać, wprowadzając do hydroponiki lub gleby związki chelatujące. Wówczas metodę tę nazywa się in-



Rys. 1. Schemat przedstawiający etapy fitoekstrakcji ciągłej

Metoda ta polega na stosowaniu roślin: **A** — będących hiperakumulatorami metali (np. *Thlaspi caerulescens*); **B** — modyfikowanych genetycznie lub somatycznych hybryd o dużej biomase (np. *Nicotiana glauca*)

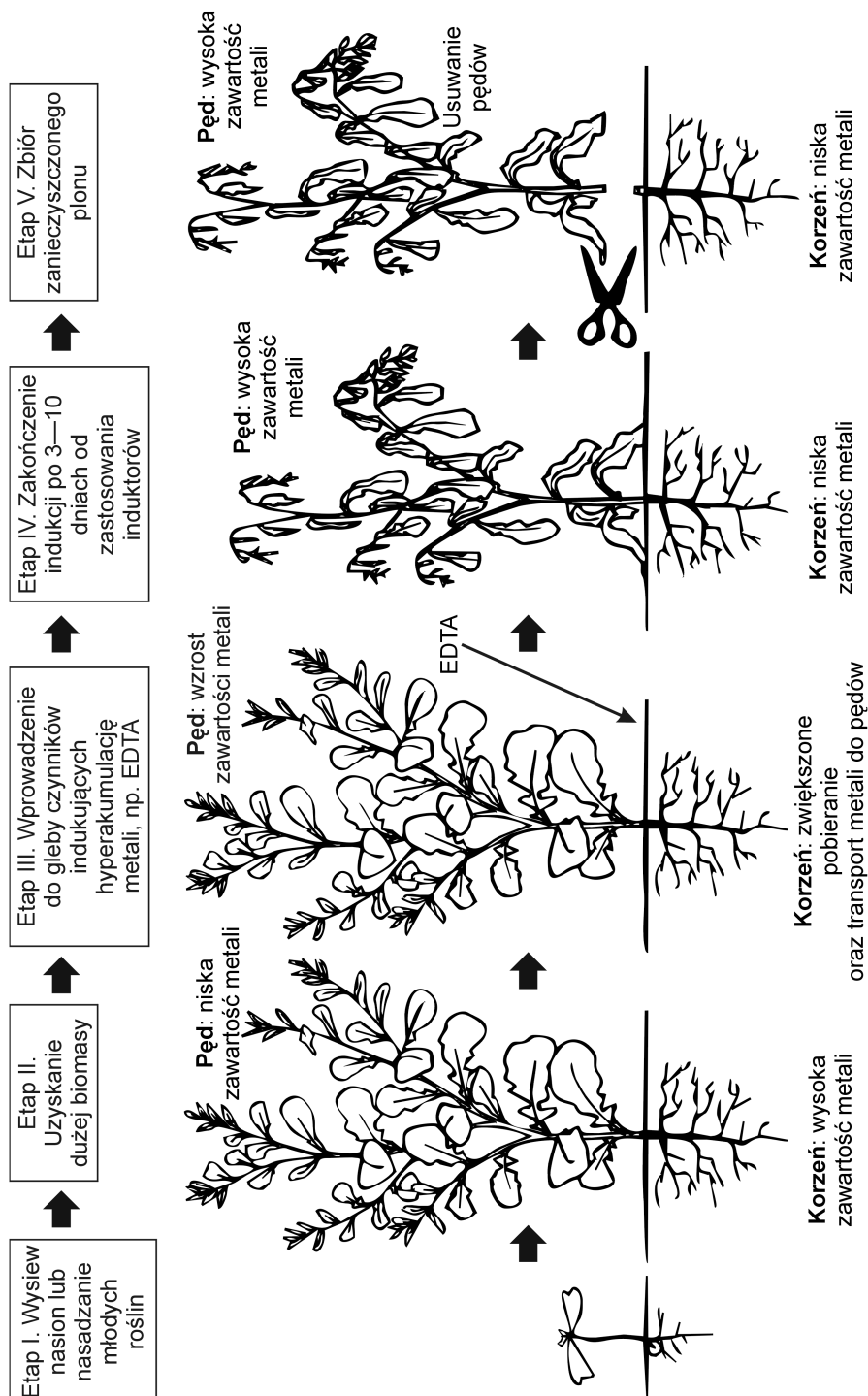
dukowaną fitoekstrakcją metali. Schematyczny przebieg fitoekstrakcji indukowanej przedstawia rys. 2.

1. Wysiew nasion lub nasadzanie młodych roślin pozyskanych z terenów niezanieczyszczonych do gleby z różną zawartością metali. Użyteczne gatunki to rośliny uprawne wytwarzające dużą biomasę, na przykład: gorczyca sarepska, słonecznik lub kukurydza.
2. Stymulowanie wzrostu roślin przez nawożenie. Akumulacja metali głównie w korzeniach i znacznie mniejsza w pędach.
3. Po uzyskaniu maksymalnej biomasy organów wegetatywnych do gleby wprowadza się związki indukujące w roślinach hyperakumulację metali. Induktory hyperakumulacji zwiększają stężenie metali w roztworze glebowym oraz indukują rośliny do ich pobierania. Najczęściej stosowanymi chemicznymi induktorami są związki chelatujące, jak EDTA. Efektem indukcji jest znaczny wzrost akumulacji metali w pędach, podczas gdy w korzeniach ich zawartość obniża się lub pozostaje niezmieniona.
4. Po okresie od 3 dni do 10 dni od wprowadzenia do gleby związków chelatujących zawartość metali w pędach jest najwyższa. W wielu przypadkach rośliny na tym etapie są zwędnięte lub częściowo obumarłe. Jest to zjawisko korzystne, ponieważ ogranicza możliwość żerowania zwierząt na materiale roślinnym, silnie zanieczyszczonym metalami.
5. Zamierające pędy roślin z wysoką zawartością metali są ścinane u podstawy i usuwane z pola.

Pierwsza publikacja opisująca wykorzystanie kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) w fitoekstrakcji Pb z zanieczyszczonej gleby została opublikowana w 1993 roku (Jørgensen, 1993). Jednak dopiero prace, które ukazały się w latach 1996 (Huang i Cunningham, 1996) i 1997 (Balylock i współpr., 1997; Huang i współpr., 1997) zapoczątkowały w wielu ośrodkach naukowych intensywne badania nad fitoekstrakcją indukowaną.

Większość dotychczas przeprowadzonych eksperymentów koncentrowała się na dwóch problemach: (1) znalezieniu związku chelatującego (chemicznego) najbardziej efektywnego w mobilizacji metali w podłożu; (2) przebadaniu jak największej liczby gatunków roślin, w celu wyboru gatunku wykazującego najwyższą zawartość metalu/metali w pędach, po zastosowaniu związku chelatującego.

Związki chelatujące stosowano przede wszystkim po to, aby przeprowadzić trudno rozpuszczalne lub nierozpuszczalne formy metali występujące w glebie w formy rozpuszczalne, a tym samym dostępne dla roślin. Równocześnie stwierdzono, że po podaniu chelatorów do zanieczyszczonej metalami gleby bardzo zwiększa się nie tylko ich pobieranie przez korzenie, ale także translokacja do części nadziemnych (Balylock i współpr., 1997; Wu i współpr., 1999; Luo i współpr., 2005; Sekhari i współpr., 2005; Quartacci



Rys. 2. Schemat przedstawiający etapy fitoekstrakcji indukowanej. Metoda ta polega na stosowaniu roślin wytwarzających dużą biomasa, głównie roślin uprawnych, niebędących hiperakumulatorami (np. *Brassica juncea*)

i współpr., 2007). Związkiem chelatującym najczęściej używanym w badaniach był EDTA (zarówno kwas wersenowy, jak i jego sole, werseniany) (tabela 1). EDTA okazał się bardzo skuteczny w przypadku Pb i powodował, w porównaniu z innymi związkami chemicznymi stosowanymi w fitoekstrakcji indukowanej, znacznie większe przechodzenie tego metalu do roztworu glebowego, nawet ze słabiej dostępnych frakcji glebowych (Wu i współpr., 2003; Meers i współpr., 2005; Komárek i współpr., 2007; Lou i współpr., 2007; Sarkar i współpr., 2008), oraz zwiększał wielokrotnie akumulację Pb w częściach nadziemnych roślin (Blaylock i współpr., 1997; Wu i współpr., 1999; Boonyapookana i współpr., 2005; Lesage i współpr., 2005; Luo i współpr., 2005; Meers i współpr., 2005; Sekhar i współpr., 2005; Zhuang i współpr., 2005; Luo i współpr., 2006a i c; Komárek i współpr., 2007; Lou i współpr., 2007). W niektórych przypadkach EDTA indukował w roślinach typową hiperakumulację, w efekcie czego stężenie Pb w pędach było wyższe niż w korzeniach (Kucharski i współpr., 1997a; Grčman i współpr., 2001; López i współpr., 2005; Zhuang i współpr., 2005; Nascimento i współpr., 2006; Luo i współpr., 2006b; Lin i współpr., 2009). EDTA zwiększał w pędach nie tylko akumulację Pb, ale także innych metali, na przykład: Cd, Cu lub Zn (Kucharski i współpr., 1997b; Ebbs, Kochian, 1998; Chen, Cutright, 2001; Wenzel i współpr., 2003; Luo i współpr., 2006a; Lou i współpr., 2007). Jednak stymulacja roślin do akumulacji innych metali w częściach nadziemnych była z reguły o wiele niższa w porównaniu z Pb (Meers i współpr., 2004; Luo i współpr., 2005; Zhuang i współpr., 2005; Luo i współpr., 2006a; Lou i współpr., 2007). W związku z tym prowadzono badania z różnymi związkami chelatującymi, które wykazywałyby większe powinowactwo do innych niż Pb metali. W efekcie Blaylock i współpr. (1997) stwierdzili, że w przypadku Cd znacznie skuteczniejszy od EDTA jest kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetylo)-N,N,N',N'-tetraoctowy (EGTA).

Z kolei akumulacja Zn i Cu w pędach była silniej stymulowana przez kwas N,N'-etylenodiaminodiburszynowy (EDDS) (Luo i współpr., 2006a). Jednak liczba publikacji poświęconych innym niż EDTA chelatorom była znacząco mniejsza (tabela 1).

Oprócz wymienionych w tabeli 1, w pojedynczych pracach przedstawiono także działanie takich związków chemicznych, jak: kwasy huminowe (Evangelou i współpr., 2004), kwas winowy (Evangelou i współpr., 2006), fitynowy (Lou i współpr., 2007), asparginowy (Nigam i współpr., 2001) lub EDGA (kwas glikoloeterodiaminotetraoctowy) (Römken i współpr., 2002).

Dodatkową przyczyną, dla której badano inne niż EDTA związki chemiczne, było stwierdzenie toksycznego działania tego związku na rośliny w trakcie fitoekstrakcji indukowanej. Po podaniu EDTA do gleby lub hydroponiki więk-

Tabela 1

Związki chemiczne stosowane w badaniach nad fitoekstrakcją indukowaną

Nazwa związku chelatującego	Stosowane ilości/stężenia	Liczba publikacji
EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy)	gleba: 0,1—20,0 mmoli/kg hydroponika: 0,01—2,5 mM	68
HEDTA (kwas N-(2-hydroksyetylo)- -etylenodiaminotrioctowy)	gleba: 0,5—2,5 g/kg	6
DTPA (kwas dietylenotriaminopentaoctowy)	gleba: 0,2—20,0 mmoli/kg hydroponika: 0,01—2,5 mM	10
EGTA (kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-amino- etylo)- N,N,N',N'-tetraoctowy)	gleba: 0,1—20,0 mmoli/kg	4
EDDHA (kwas etylenodiamino- -N,N'-bis(2-hydroksyfenylooctowy))	gleba: 0,2—20,0 mmoli/kg	2
EDDS (kwas N,N'-etylenodiaminodibursztynowy)	gleba: 1,0—10,0 mmoli/kg hydroponika: 0,5—5,0 mM	18
NTA (kwas nitrylotrioctowy)	gleba: 0,2—52,0 mmoli/kg hydroponika: 10,0 mM	11
CDTA (kwas <i>trans</i> -1,2-cykloheksylenodinitrilo- tetraoctowy)	gleba: 0,1—20,0 mmoli/kg	4
HEIDA (kwas N-(2-hydroksyetylo)iminodioctowy)	gleba: 0,2—20,0 mmoli/kg	2
HBED (kwas N,N'-bis(2-hydroksybenzylo)etyleno- diamino-N,N'-dioctowy)	gleba: 1,5 mmola/kg	1
Kwas cytrynowy	gleba: 0,1—250,0 mmoli/kg hydroponika: 0,025—0,500 mM	16
Kwas octowy	gleba: 0,2—5,0 mmoli/kg	3
Kwas jabłkowy	gleba: 0,1—20,0 mmoli/kg hydroponika: 0,010—0,500 mM	6
Kwas szczawiowy	gleba: 2,0—250,0 mmoli/kg hydroponika: 0,010—0,500 mM	6
Siarka elementarna (S ⁰)	gleba: 20,0—200,0 mmoli/kg	3

W tabeli podano także zakres stosowanych stężeń oraz liczbę publikacji (1996—2008) opisujących działanie wymienionych związków chelatujących.

szość autorów obserwowała: zmniejszoną ilość suchej masy, obniżoną transpirację, wędnięcie, chlorozę i nekrozy liści, a w rezultacie zasychanie całych roślin (Kucharski i współpr., 1997b; Vassil i współpr., 1998; Epstein i współpr., 1999; Chen, Cutright, 2001; Schmidt, 2003; Saifullah i współpr., 2009 i cytowana tam literatura). Jednak silny, toksyczny efekt EDTA widoczny był najczęściej wtedy, gdy dodawano go do gleby przed wysianiem nasion, w związku z czym przez cały okres wegetacji rośliny miały kontakt ze związkiem chelatującym i jego kompleksami z metalami (Chen, Cutright, 2001; Saifullah i współpr., 2009 i cytowana tam literatura). Biorąc pod uwagę typowy schemat postępowania przedstawiony

na rys. 2, problem ten traci na znaczeniu. EDTA jest bowiem wprowadzany do gleby po uzyskaniu maksymalnej biomasy wegetatywnych części roślin, które zbiera się najczęściej po 5—7 dniach od podania induktora. Nie ma więc już istotnego wpływu na ostateczną ilość masy roślinnej. Wprost przeciwnie, wędnięcie i zasychanie roślin po indukcji do hyperakumulacji powinno być uznane jako zjawisko korzystne, ograniczające możliwość wykorzystania przez zwierzęta zanieczyszczonej biomasy jako pokarmu. Mechanizm toksycznego działania EDTA na rośliny nie jest do tej pory w pełni wyjaśniony. Jako przyczynę negatywnego działania na rośliny najczęściej wymienia się wiązanie pierwiastków niezbędnych do wzrostu roślin (Cu, Zn, Fe, Ca), co przyczynia się do zaburzeń w metabolizmie komórek i funkcjonowaniu błon biologicznych (Vassili i współpr., 1998; Saifullah i współpr., 2009 i cytowana tam literatura).

Podkreśla się również negatywne oddziaływanie EDTA na środowisko glebowe. Pierwsze wyniki badań tego problemu (Galiulin i współpr., 1998) nie wykazały jednak ujemnego wpływu różnych stężeń tego związku (1,0—20,0 mmoli/kg) na aktywność takich enzymów glebowych, jak: dehydrogenaza, celulaza i katalaza. W trakcie trwającej 63 dni inkubacji nie stwierdzono obniżenia aktywności żadnego z badanych enzymów, nawet gdy do gleby podano EDTA w ilości 10 mmoli/kg. Określono także wpływ oddziaływania EDTA na mikroorganizmy glebowe. Badania te nie potwierdziły negatywnego wpływu chelatora, w dawkach nie przekraczających 10 mmoli/kg, na biomase bakterii i promieniowców (Grčman i współpr., 2001, 2003) oraz indukowane glukozą oddychanie mikroorganizmów (Kos, Leštan, 2003, 2004b). Nie zaobserwowano również istotnego wpływu chelatora na bakterie z rodzaju *Sinorhizobium* sp. po podaniu do gleby EDTA w ilości 2 mmoli/kg (Di Gregorio i współpr., 2006). Wrażliwe na EDTA, w przeciwieństwie do bakterii, okazały się grzyby glebowe, których biomasa obniżała się już po wprowadzeniu do podłoża chelatora w ilości 5 mmoli/kg (Grčman i współpr., 2001, 2003). W przypadku grzybów z gromady *Glomeromycota* (da Silva i współpr., 2006), tworzących z korzeniami roślin mikoryzę arbuskularną (AM) (Rillig, 2004), uzyskano niejednoznaczne wyniki. Podczas gdy Grčman i współpr. (2001) stwierdzili brak AM po jednorazowym potraktowaniu gleby EDTA w ilości 5 mmoli/kg lub 10 mmoli/kg, Chen i współpr. (2004a) nie zaobserwowali istotnego wpływu tego chelatora na wielkość kolonizacji mikoryzowej nawet po zastosowaniu 10 mmoli/kg. Bardziej szczegółowe badania przeprowadzili Jurkiewicz i współpr. (2004). Wykazali oni również brak negatywnego działania EDTA w ilości 1,2 mmoli/kg na wielkość kolonizacji AM, jednak aktywność metaboliczna grzybów mikoryzowych była istotnie obniżona w stosunku do kontroli.

W odróżnieniu od toksycznego wpływu na mikroorganizmy glebowe, prawdę poważnym problemem związanym z podaniem EDTA do gleby jest

możliwość ługowania metali i ich transportu do wód podziemnych, wód powierzchniowych lub do sąsiednich ekosystemów. Takie zjawisko ługowania Cd, Cu, Pb i Zn po zastosowaniu związków kompleksujących zostało zaobserwowane przez wielu autorów (Grčman i współpr., 2001; Römken i współpr., 2002; Kosi Leštan, 2003; Wenzel i współpr., 2003). Aby ograniczyć możliwość powstawania odcieków, stosowano także związki chemiczne zwiększające indukującą hyperakumulację działanie EDTA, dzięki czemu można było obniżyć ilość chelatora wprowadzanego do gleby. Przykładem takiego związku jest glifosat (N-(fosfonometyl)glicyna). Jednak wyniki uzyskane w przypadku użycia glifosatu nie są jednoznaczne. Kayser i współpr. (1999a, cyt. za: Schmidt, 2003) oraz Mathis i Kayser (2001, cyt. za: Schmidt, 2003) stwierdzili znaczny wzrost akumulacji Pb lub Cu w pędach gorczycy sarepskiej po wprowadzeniu EDTA do gleby i opryskaniu roślin glifosatem. Z kolei Maxted i współpr. (2001, cyt. za: Schmidt, 2003) oraz Wilde i współpr. (2005) nie obserwowali zwiększonej zawartości Cd lub Pb po zastosowaniu EDTA i glifosatu, w porównaniu z wariantami, w których podano wyłącznie EDTA. Nie znany jest także mechanizm działania glifosatu na stymulację pobierania toksycznych metali, takich jak Pb i Cd. Na poziomie molekularnym działanie glifosatu polega na inhibicji szlaku kwasu szikimowego (Amrhein i współpr., 1980; Holländer, Amrhein, 1980), przez hamowanie aktywności syntazy 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanowej, co ogranicza syntezę aminokwasów aromatycznych (Hetherington i współpr., 1999 i cytowana tam literatura; Wakabayashi, Böger, 2004). Na poziomie komórkowym (izolowane komórki lub kalus) związek ten powoduje hamowanie wzrostu i podziałów komórek (Haderlie i współpr., 1977; Gresshoff, 1979), ogranicza pobieranie Rb i P (Brecke, Duke, 1980) oraz modyfikuje wytwarzanie etylenu (Lee, Dumas, 1983). Do wnętrza komórek transportowany jest przez symporter H^+/P (Denis, Delrot, 1993; Hetherington i współpr., 1998; Deléage-Grandon i współpr., 2001), w związku z czym jego wnikanie do komórki jest ograniczane przez fosforany (Denis, Delrot, 1993) oraz inhibitory pmH^+ -ATPazy (Hetherington i współpr., 1998). Glifosat podany dolistnie transportowany jest głównie floemem zarówno do wyżej położonych części pędu, jak i do kłączy oraz korzeni (Sprankle i współpr., 1975; Fernandez, Bayer, 1977; Schultz, Burnside, 1980; Coupland, 1983; Reddy, 2000). Czynniki korzystnie wpływającymi na absorpcję herbicydu oraz jego transport w roślinie są wysoka temperatura ($30^{\circ}C$) i wysokie natężenie światła (Schultz, Burnside, 1980; Coupland, 1983; Devine i współpr., 1983; Reddy, 2000). Toksyczne działanie glifosatu na poziomie organizmalnym jest bardzo różnorodne. Wywiera on wpływ na ilość endogennego ABA i IAA, w jednych gatunkach zwiększając, a w przypadku innych zmniejszając stężenie tych fitohormonów

(Rajasekaran i wspólr., 1987 i cytowana tam literatura). Hamuje bazy-petalny transport auksyny (Baur, 1979), proces fotosyntezy oraz zmienia dystrybucję substancji pokarmowych (Sprankle i wspólr., 1975; Geiger i wspólr., 1986; Servaites i wspólr., 1987; Shieh i wspólr., 1991; Fuchs i wspólr., 2002), co między innymi zakłóca wzrost roślin (Baur i wspólr., 1977). Bardzo charakterystycznym zjawiskiem działania glifosatu jest ograniczanie przewodnictwa szparkowego i transpiracji, co stwierdzono u różnych gatunków roślin (Shaner, 1978; Brecke, Duke, 1980; Shaner, Lyon, 1980; Jachetta i wspólr., 1986; Muñoz-Rueda i wspólr., 1986; Fuchs i wspólr., 2002). Najnowsze badania wykazały, że glifosat wpływa także na ekspresję 24 genów w siewkach *Glycine max*. Żaden z tych genów nie wydaje się jednak związany z pobieraniem metali przez roślinę (Yu i wspólr., 2007).

Podstawowym elementem fitoekstrakcji jest roślina. W przypadku fitoekstrakcji ciągłej badania skoncentrowały się przede wszystkim na procesach zachodzących w roślinach i decydujących o akumulacji metali w pędach (McGrath i wspólr., 2002; Krämer i wspólr., 2007; Verbruggen i wspólr., 2009; Verkleij i wspólr., 2009). Natomiast eksperymenty nad fitoekstrakcją indukowaną dotyczyły głównie selekcji roślin w celu wyboru gatunków lub kultywarów, charakteryzujących się najwyższą zawartością metalu/metali w pędach po zastosowaniu czynnika indukującego. Znacznie mniej uwagi poświęcono mechanizmom i czynnikom decydującym o poziomie akumulacji metali w częściach nadziemnych.

Z tabeli 2 wyraźnie wynika, że 3 gatunki: gorczyca sarepska (*Brassica juncea*), słonecznik (*Helianthus annuus*) oraz kukurydza (*Zea mays*), dotychczas najczęściej badano, jako użyteczne w tym procesie. Po raz pierwszy zjawisko indukcji roślin do hyperakumulacji Pb zostało opisane przez Huang i Cunningham (1996). Po podaniu HEDTA w ilości 2 g/kg do gleby zanieczyszczonej Pb autorzy ci zaobserwowali wyższe stężenie tego metalu w pędach niż w korzeniach kukurydzy. W efekcie akumulacja Pb w częściach nadziemnych przekraczała 10 000 mg/kg s.m. (Huang i Cunningham, 1996).

Również Blaylock i wspólr. (1997) stwierdzili zawartość Pb przekraczającą 10 000 mg/kg s.m. w pędach gorzycy sarepskiej po podaniu do gleby EDTA w ilości 5 mmoli/kg lub 10 mmoli/kg. Huang i wspólr. (1997) wykazali podobną zawartość Pb w pędach słonecznika, jak w przypadku kukurydzy po zastosowaniu HEDTA. Opisane wcześniej wyniki doświadczeń zapoczątkowały intensywne badania nad możliwością użycia wymienionych 3 gatunków roślin w fitoekstrakcji indukowanej. Dalsze badania potwierdziły jednak słabszą zdolność *Zea mays* do akumulacji w pędach Pb, Cd lub Zn, po wprowadzeniu chelatora do gleby, w porównaniu z innymi gatunkami roślin. Wyższe zawartości metali w częściach nadziemnych w porównaniu z kukurydzą

Tabela 2

Gatunki roślin i związki chemiczne stosowane w badaniach fitoekstrakcji indukowanej w latach 1996—2009

Gatunek rośliny	Związki chemiczne	Liczba publikacji
Dwuliścienne		
<i>Brassica juncea</i>	EDTA, HEDTA, DTPA, NTA, S ⁰ , kwasy: cytrynowy, jabłkowy, octowy, szczawiowy, wanilinowy, galusowy	19
<i>Brassica rapa</i>	EDTA, EDDS, DTPA, kwas cytrynowy	8
<i>Helianthus annuus</i>	EDTA, HEDTA, EDDS, DTPA, NTA, CDTA, S ⁰ , kwas cytrynowy	15
<i>Nicotiana tabacum</i>	EDTA, EDDS, DTPA, NTA, S ⁰ , kwasy: cytrynowy, szczawiowy, winowy	5
<i>Pisum sativum</i>	EDTA, HEDTA, DTPA, CDTA, EGTA, EDDHA	4
<i>Phaseolus vulgaris</i>	EDTA, EDDS, kwas cytrynowy	4
<i>Sesbania drummondii</i> lub <i>S. rostrata</i>	EDTA, HEDTA, DTPA, NTA, kwas cytrynowy i szczawiowy	5
<i>Populus</i> spp. i <i>Salix</i> spp.	EDTA, EDDS, DTPA, NTA, S ⁰	4
Jednoliścienne		
<i>Zea mays</i>	EDTA, HEDTA, EDDS, DTPA, NTA, CDTA, HEIDA, HBED, EGTA, EDDHA, S ⁰ , kwas: cytrynowy, jabłkowy, asparaginowy, askorbinowy, szczawiowy, salicylowy	18
<i>Triticum aestivum</i>	EDTA, DTPA, S ⁰ , kwas: cytrynowy, jabłkowy, szczawiowy	4
<i>Vetiveria zizanioides</i>	EDTA, HEDTA, DTPA, NTA, CDTA, HEIDA, EGTA, kwas cytrynowy i jabłkowy	6

zaobserwowano w *Brassica juncea* (K u c h a r s k i i w s p ó ł p r . , 1997a; C h e n i w s p ó ł p r . , 2004b), *Pisum sativum* (H u a n g i w s p ó ł p r . , 1997; C h e n i w s p ó ł p r . , 2007), *Phaseolus vulgaris* (L u o i w s p ó ł p r . , 2005, 2007), *Vetiveria zizanioides* (C h i u i w s p ó ł p r . , 2005) i *Helianthus annuus* (K a y s e r i w s p ó ł p r . , 2000; C h e n i w s p ó ł p r . , 2004b; M e e r s i w s p ó ł p r . 2005). Ponadto C h e n i w s p ó ł p r . (2004b), w badaniach 4 gatunków jednoliściennych oraz 6 dwuliściennych, stwierdzili wyższe stężenia Pb w pędach roślin dwuliściennych w porównaniu z roślinami jednoliściennymi, zarówno w przypadku roślin kontrolnych, jak i traktowanych EDTA.

Oprócz wymienionych w tabeli 2 gatunków roślin, w nielicznych pracach omawiano rezultaty uzyskane z zastosowaniem także innych gatunków, na przykład: *Brachiaria decumbens* (S a n t o s i w s p ó ł p r . , 2006), *Chrysanthemum coronarium* (L u o i w s p ó ł p r . , 2006d), *Lactuca sativa* (K u l i i w s p ó ł p r . , 1999), *Raphanus sativus* (C h e n i w s p ó ł p r . , 2003), *Dianthus chinensis* (L a i i w s p ó ł p r . , 2007), *Prosopis* spp. (A l d r i c h i w s p ó ł p r . , 2004), *Halimione*

portulacoides (Duarte i współpr., 2007), *Silene vulgaris* (Nadgórska-Socha i współpr., 2006).

Analiza literatury wyraźnie wskazuje, że doboru związków indukujących hyperakumulację dokonywano, biorąc pod uwagę wiele czynników, między innymi: zdolność do desorpcji metali (Pb, Cd, Cu, Zn) z gleby i ich wiązania (chelatowania), trwałość powstałych kompleksów, rozpuszczalność kompleksów metaloorganicznych w wodzie, szybkość rozkładu fizykochemicznego i biologicznego czystych chelatorów, jak również powstałych z metalami kompleksów (Alkorta i współpr., 2004; Nowack i współpr., 2006; Evangelou i współpr., 2007; Leštani i współpr., 2008; Saifullah i współpr., 2009). W odróżnieniu od doboru związków chelatujących, doboru gatunków roślin dokonywano, kierując się głównie ilością wytwarzanej biomasy (np.: *B. juncea*, *Z. mays*, *H. annuus*) i/lub odpornością na toksyczne działanie metali (*Silene vulgaris*, *Dianthus chinensis*) (Saifullah i współpr., 2009). Natomiast prawie w ogóle nie brano pod uwagę właściwości fizjologicznych roślin, jak również ich budowy anatomicznej. Za mało jest też danych o mechanizmach indukujących hyperakumulację oraz czynnikach decydujących o poziomie akumulacji metali po indukcji roślin.

1.4. Pobieranie Pb i Cd przez korzenie roślin i ich transport do pędów

Korzenie roślin mogą pobierać z podłoża makro- i mikroelementy wyłącznie w postaci form rozpuszczalnych w wodzie, głównie prostych jonów nieorganicznych (Bloom, 2006), rzadziej jonów kompleksowych (Ross, 1994b; Welch, Norvell, 1999), dlatego roztwór glebowy jest ich bezpośrednim źródłem (Jungk, 2002). W procesie pobierania można wyróżnić dwa etapy. Pierwszy, zależny od biernych procesów dyfuzji lub przepływu masowego, związany jest z wnikaniem jonów do przestworów międzykomórkowych i ścian komórkowych (apoplast) komórek korzenia i przebiega stosunkowo szybko (Jungk, 2002). Może on zachodzić nawet w przypadku martwych organów (Ross, Kay, 1994). Drugi związany jest z pobieraniem jonów przez komórki korzeni, a więc transportem przez błony. Ten etap zachodzi wyłącznie w przypadku żywych organów, zależy więc bezpośrednio lub pośrednio od energii zmagazynowanej w ATP (Marschner, 1995).

Część jonów pobranych przez korzenie roślin z roztworu glebowego może być transportowana apoplastem w kierunku walca osiowego aż do endodermi. Ze względu na występujące w ścianach komórek tej warstwy pasemka Caspary'ego lub lamele suberynowe dalszy transport apoplastyczny jest bardzo utrud-

niony lub wręcz niemożliwy. Jony te muszą być najpierw przetransportowane przez błonę do wnętrza komórek endodermy, skąd drogą symplastyczną (przez plazmodesmy) dostają się do walca osiowego, przede wszystkim do perycyklu i komórek miękiszu ksylemowego. Stąd ponownie są transportowane przez błonę, aby ostatecznie dotrzeć do naczyń ksylemu (Marschner, 1995; Assmann, 2006). Jony mogą być również pobierane przez komórki ryzodermy lub komórki kory pierwotnej, a następnie transportowane symplastycznie do walca osiowego, do komórek perycyklu i miękiszu ksylemowego. Zaprezentowane wcześniej drogi transportu w poprzek korzenia wskazują na bardzo dużą rolę endodermy, a także perycyklu i miękiszu ksylemowego jako komórek korzenia, dzięki którym roślina reguluje skład jonowy roztworu transportowanego ksylemem do pędów (Assmann, 2006).

Prace mające na celu wyjaśnienie zjawiska hyperakumulacji metali w roślinach przyczyniły się do odkrycia systemów transportowych umożliwiających pobieranie metali przez komórki korzeni, załadunek ksylemu oraz ich akumulację w pędach (Krämer i wspólr., 2007; Antosiewicz i wspólr., 2008; Verbruggen i wspólr., 2009). Badania te wykazały, że nie ma w roślinach układów transportowych służących do pobierania takich metali, jak Cd i Pb. Natomiast pierwiastki te są transportowane do wnętrza komórek roślinnych przez systemy transportowe służące do pobierania pierwiastków o funkcjach fizjologicznych (Antosiewicz i wspólr., 2008). W przypadku Cd stwierdzono, że metal ten jest transportowany przez plazmolemę systemami transportującymi Fe i Zn (Verkleij i wspólr., 2009) lub Ca (Perfuss-Barbeoch i wspólr., 2002). Znacznie mniej wiadomo na temat pobierania Pb przez komórki roślin. Wyniki uzyskane przez Araziego i wspólr. (1999) oraz Sun kara i wspólr. (2000) wskazują na kanał bramkowany cyklicznymi nukleotydami, będący niespecyficznym kanałem kationowym, jako główną drogę wnikania tego metalu. Występuje również prawdopodobieństwo pobierania Pb przez kanały wapniowe (Huang, Cunningham, 1996).

Badania ostatnich lat pozwoliły na wstępne określenie układów transportujących, niezbędnych do hyperakumulacji Cd. Pierwiastek ten dostaje się do komórek korzeni przez specyficzne dla Fe nośniki uniportowe IRT (Krämer i wspólr., 2007; Verbruggen i wspólr., 2009) lub systemy transportowe NRAMP (Verkleij i wspólr., 2009). Może być także pobierany przez nośniki uniportowe ZIP (ZNT1), specyficzne dla Zn (Krämer i wspólr., 2007; Antosiewicz i wspólr., 2008; Verbruggen i wspólr., 2009). W hyperakumulatorach kadmu pobieranie tego metalu przez kanał Ca wydaje się nie mieć istotnego znaczenia. Po wniknięciu do cytoplazmy część jonów Cd przemieszcza się symplastem bezpośrednio do walca osiowego, większość jednak jest transportowana do wakuoli komórek korzeni przez tonoplastowe antyportery MTP ($\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$) (Krämer, 2005). Zapewnia to utrzymanie koncentracji tego metalu w cytoplazmie na bezpiecznym poziomie. W przypadku

hyperakumulatorów czas przebywania Cd w wakuoli jest krótki. Metal ten jest transportowany ponownie do cytoplazmy przez transportery NRAMP (K r ä - m e r i w s p ó ł p r . , 2007) i przemieszcza się do walca osiowego. W walcu osiowym z komórek miękiszu ksylemowego oraz perycyklu Cd jest wypompowywany do apoplastu za pomocą pomp HMA, dzięki czemu dochodzi do załadunku ksylemu (V e r b r u g g e n i w s p ó ł p r . , 2009). ATPazy HMA należą do rodziny ATPaz typu P, do której zaliczana jest także pmH⁺-ATPaza (A x e l s e n , P a l m g r e n , 2001). Ksylemem kadm jest transportowany do pędów głównie w formie jonów Cd²⁺ (V e r b r u g g e n i w s p ó ł p r . , 2009). W liściach, po opuszczeniu naczyń i cewek, Cd jest pobierany przez komórki za pomocą systemów transportowych ZIP lub IRT, a następnie transportowany do wakuoli przez transportery MTP (K r ä m e r i w s p ó ł p r . , 2007). Sekwestracja Cd w wakuolach komórek pędów jest głównym sposobem detoksyfikacji i decyduje o wysokiej odporności hyperakumulatorów na toksyczne działanie tego metalu (V e r b r u g g e n i w s p ó ł p r . , 2009). Natomiast w ciągu ostatnich lat nie prowadzono eksperymentów nad mechanizmami hyperakumulacji Pb w roślinach, między innymi ze względu na brak pewnych dowodów na występowanie tego zjawiska (por. s. 24).

Z przedstawionego przeglądu literatury wynika, że badania and czynnikami i mechanizmami decydującymi o hyperakumulacji Cd są już znacznie zaawansowane. Umożliwi to tworzenie roślin modyfikowanych genetycznie, zarówno wytwarzających dużą biomasę, jak również mających zdolność do hyperakumulacji Cd. Pozwoli to także na lepsze wykorzystanie naturalnych hyperakumulatorów, co niewątpliwie spowoduje szybszy rozwój fitoekstrakcji ciągłej.

Z zupełnie odmienną sytuacją mamy do czynienia w przypadku fitoekstrakcji indukowanej. Bardzo niekompletne są nadal dane na temat mechanizmów wywołujących zjawisko hyperakumulacji w roślinach niebędących hyperakumulatorami, jak również czynników roślinnych decydujących o poziomie akumulacji Pb i Cd w pędach, mimo wielu danych na temat pobierania i transportu nieorganicznych form Pb i Cd w takich roślinach.

Ołów jest łatwo absorbowany z roztworu przez tkanki korzenia, a następnie przemieszcza się radialnie przez korę pierwotną aż do endodermy drogą apoplastyczną i symplastyczną (W i e r z b i c k a , 1987a i b). Komórki endodermy stanowią barierę dla radialnego transportu Pb, chociaż obserwowano przemieszczanie się Pb przez komórki przepustowe (T u n g , T e m p l e , 1996). W przypadku wielu gatunków roślin stwierdzono, że metal ten, podany w formie niechelatowej, akumuluje się głównie w korze pierwotnej, tylko w niewielkim stopniu docierając do walca osiowego (W i e r z b i c k a , 1987b; T u n g , T e m p l e , 1996; J a r v i s , L e u n g , 2001). W efekcie zawartość Pb w pędach jest zawsze o wiele niższa niż w korzeniach (M a ł k o w s k i i w s p ó ł p r . , 2002; P i e c h a ł a k i w s p ó ł p r . , 2002; A n t o s i e w i c z , 2005; W o j a s i w s p ó ł p r . , 2007; X u i w s p ó ł p r . , 2007). Podobnie jak w przypadku ołowiu,

również poziom akumulacji kadmu w korzeniach jest wyższy od akumulacji tego pierwiastka w pędach (Greger, Lindberg, 1986; Wójcik, Tukiendorf, 2005; Gadapati, Macfie, 2006; Wojas i współpr., 2008). Jednak w odróżnieniu od Pb, znacznie większe ilości Cd dostają się przez endodermę do walca osiowego, a w konsekwencji do części nadziemnych, co między innymi stwierdzono u *Arabidopsis thaliana* (Wójcik, Tukiendorf, 2004; Van Belleghem i współpr., 2007).

Znacznie mniej wiadomo na temat pobierania i transportu obu metali w postaci chelatów z EDTA, z czym mamy do czynienia w fitoekstrakcji indukowanej. Badania wykazały, że po wprowadzeniu EDTA do płynnych pożywek lub gleby związek ten tworzy rozpuszczalne w wodzie kompleksy z Pb i Cd (Collins i współpr., 2001; Sarret i współpr., 2001; Geebelen i współpr., 2002). Większość naukowców akceptuje pogląd, że powstałe chelaty wnikają do korzeni i przemieszczają się apoplastem aż do endodermi. Dane na temat przenikania takich kompleksów przez endodermę i ich transportu do pędów nie są już tak jednoznaczne. Tanton i Crowdy (1971) zakładali, że kompleksy PbEDTA transportowane są w roślinie przede wszystkim drogą apoplastyczną, a jedynym miejscem, w którym wykryli obecność Pb w symplasmie, były komórki endodermi znajdujące się na wprost naczyń ksylemu oraz komórki przepustowe. Sugerowali więc, że jest to jedyne miejsce, w którym kompleks PbEDTA wnika do komórek, chociaż nie wykluczali także, że chelaty mogą się przemieszczać do walca osiowego apoplastem, mimo pasemek Caspary'ego. Uważali, że z walca osiowego kompleksy PbEDTA mogą apoplastem docierać do ksylemu, a następnie do części nadziemnych, gdzie po opuszczeniu naczyń i cewek odkładają się wyłącznie w apoplasmie liści. Nowsze badania potwierdziły obecność kompleksów CdEDTA w ksylemie *Hordeum vulgare* (Collins i współpr., 2001) oraz CdEDTA i PbEDTA w ksylemie *Brassica juncea* (Schaidler i współpr., 2006). Z kolei Sarret i współpr. (2001) wykazali obecność PbEDTA w liściach *Phaseolus vulgaris*. Dowodzi to, że Pb i Cd dostają się przez endodermę do ksylemu w formie chelatów i w takiej postaci są transportowane w naczyniach do liści. Mniej jednoznaczny jest mechanizm pobierania kompleksów przez komórki roślinne i ich transport przez endodermę. Podczas gdy Collins i współpr. (2001) oraz Schaidler i współpr. (2006) zakładają, że transport ten odbywa się wyłącznie apoplastycznie, Tanton i Crowdy (1971) oraz Bell i współpr. (2003) biorą w tym przypadku pod uwagę pewną rolę transportu symplastycznego. Badania Jarvis i Leunga (2001, 2002) wskazują, że obie drogi są możliwe, lecz jest to uzależnione od gatunku rośliny. Po podaniu PbEDTA do roztworu hydroponicznego zaobserwowali bowiem obecność Pb w mitochondriach, amyloplastach i plazmodesmach pędów *Chamaecystis proliferus* (Jarvis, Leung (2001) oraz brak tego metalu w symplasmie pędów *Pinus radiata* (Jarvis, Leung (2002).

Nie w pełni wyjaśniona jest też indukcja hyperakumulacji Pb i Cd przez EDTA i inne związki chelatujące. Jedną z hipotez (Vassil i współpr., 1998) zakłada, że związek chelatujący po wnikięciu do korzenia wiąże jony Zn^{2+} i Ca^{2+} znajdujące się na powierzchni plazmolemy komórek, co powoduje zwiększenie przepuszczalności błon. Wzrost przepuszczalności pozwala na masowe wnikanie kompleksów EDTA z metalami do walca osiowego, a następnie do ksylemu. Po dotarciu do ksylemu dalszy transport chelatów całkowicie zależy od natężenia transpiracji (Blaylock i współpr., 1997; Vassil i współpr., 1998). Na podstawie tak postawionej hipotezy można jedynie przypuszczać, że po indukcji kompleksy PbEDTA będą przemieszczać się do ksylemu zarówno przez komórki korzenia, a więc drogą symplastyczną, jak i za pomocą ścian i przestworów międzykomórkowych, a więc drogą apoplastyczną. Obecnie brak jest zgody co do sposobu transportu PbEDTA lub CdEDTA do ksylemu. Na podstawie tej hipotezy oraz przedstawionych wcześniej wyników eksperymentów innych autorów (Tanton, Crowdy, 1971; Jarvis, Leung, 2001, 2002; Collins i współpr., 2001; Sarret i współpr., 2001; Bell i współpr., 2003; Schaidler i współpr., 2006) można przypuszczać, że kompleksy metali z EDTA przemieszczają się do walca osiowego wyłącznie drogą apoplastyczną (Nowack i współpr., 2006; Hernández-Allica i współpr., 2007; Leštan i współpr., 2008) lub apoplastyczną i symplastyczną (Chaney i współpr., 2007; Meers i współpr., 2008; Saifullah i współpr., 2009). Tak więc nadal sposób, w jaki PbEDTA i CdEDTA transportowany jest do walca osiowego, nie jest rozstrzygnięty jednoznacznie. Należy też podkreślić brak danych na temat wpływu EDTA i jego kompleksów z Pb lub Cd na przepuszczalność błon, chociaż wzrost przepuszczalności błon komórek korzenia jest jedną z podstawowych tez hipotezy Vassila i współpr. (1998).

1.5. Poglądy na rolę transpiracji w indukowanej fitoekstrakcji Pb i Cd

Na transpirację jako główną siłę decydującą o poziomie akumulacji PbEDTA w pędach roślin wskazywali Blaylock i współpr. (1997). Twierdzenie to było jednak oparte wyłącznie na pobieżnej obserwacji prostych eksperymentów. Zdaniem tych autorów, ustawienie doniczek z *Brassica juncea* w pobliżu wentylatora zwiększało o 30% indukowaną EDTA akumulację Pb w pędach, natomiast przykrycie roślin plastikowymi osłonami zmniejszało akumulację Pb o 35%. Z kolei Epstein i współpr. (1999) obserwowali brak bezpośredniej zależności między transpiracją a akumulacją Pb w pędach gor-

czycy sarepskiej traktowanej EDTA. Po wprowadzeniu do gleby sztucznie zanieczyszczonej Pb związku kompleksującego w ilości 5 mmoli/kg nie wykazali zmian w transpiracji w stosunku do kontroli. Jednak po podaniu 10 mmoli EDTA/kg gleby, po 24 godzinach, stwierdzili 20% hamowanie transpiracji, a po 7 dniach proces ten był ograniczony o 80%. Także całkowita ilość wytranspirowanej wody przez rośliny poddane działaniu 10 mmoli EDTA/kg była po 7 dniach o 60% mniejsza niż w kontroli oraz roślinach traktowanych niższym ze stosowanych stężeń EDTA. Równocześnie zawartość Pb w pędach roślin rosnących w glebie z dodatkiem 5 mmoli EDTA wynosiła 435 mg/kg s.m., natomiast w pędach roślin traktowanych 10 mmoli EDTA wyniosła 1 930 mg/kg, mimo silnego hamowania transpiracji przez wyższą dawkę wersenianu. Zdaniem Epstein i współpr. (1999), rezultaty te wyraźnie przeczą założeniu, że transpiracja jest głównym i jedynym czynnikiem decydującym o wielkości akumulacji Pb w pędach po indukcji hyperakumulacji w roślinach przez EDTA. Mimo tak sprzecznych wyników, wciąż ukazuje się niewiele prac poświęconych temu zagadnieniu.

Znane są też inne badania wpływu na transpirację związków chelatujących oraz związków chelatujących i metali. Wykazano w nich, że EDTA oraz takie metale, jak Pb czy Cd, podane oddzielnie do środowiska wzrostu roślin powodują spadek natężenia transpiracji (Vassil i współpr., 1998; Hernández-Allica i współpr., 2007; Barrutia i współpr., 2010). Natomiast podane łącznie nie miały negatywnego wpływu na intensywność tego procesu, zwłaszcza jeśli stosowano je w takich samych stężeniach lub ilościach (Vassil i współpr., 1998; Wu i współpr., 1999; Wenzel i współpr., 2003; Hernández-Allica i współpr., 2007; Barrutia i współpr., 2010). Jednak Saifullah i współpr. (2010) w przypadku *Triticum aestivum*, w zależności od rodzaju gleby, obserwowali wzrost lub spadek natężenia transpiracji po wprowadzeniu EDTA do gleby zanieczyszczonej Pb. Z kolei Wu i współpr. (1999) stwierdzili brak wpływu HBED na transpirację kukurydzy rosnącej w obecności 2 500 mg Pb/kg gleby, gdy tymczasem w tych samych warunkach EDTA stymulował ten proces. Najwyższe natężenia transpiracji obserwowano w 7. dniu od podania chelatora do gleby (Wu i współpr., 1999). Ten stymulujący wpływ EDTA na transpirację w trakcie fitoekstrakcji indukowanej nie został jednak do tej pory potwierdzony przez innych autorów.

1.5.1. Związki modyfikujące natężenie transpiracji oraz rola transpiracji w indukowanej fitoekstrakcji Pb i Cd

Do związków chemicznych, które powodują otwieranie lub zamykanie szparek, a w ten sposób stymulują lub hamują natężenie transpiracji w roślinach, należą przede wszystkim regulatory roślinne. Zalicza się do nich zarówno endogenne, roślinne regulatory wzrostu i rozwoju, zwane fitohormonami (auksyny, gibereliny, cytokoniny, kwas abscysynowy), jak i egzogenne związki chemiczne, na przykład wytwarzaną przez grzyby fuzikokcyne (Jankiewicz, 1995a).

Auksyny, gibereliny i cytokininy należą do stymulatorów wzrostu i rozwoju roślin. Powszechnie występującą w roślinach auksyną jest kwas indolilo-3-octowy (IAA). Na poziomie komórkowym IAA stymuluje aktywność plazmolemowej pompy protonowej (pmH^+ -ATPazy) (Bunney i wspóln., 2002), powodując w ten sposób hyperpolaryzację potencjału błonowego (Felle i wspóln., 1991; Karcz, Burdach, 2007), dzięki czemu dochodzi do zwiększonego pobierania jonów K^+ (Blatt, Thiel, 1993; Claussen i wspóln., 1997). Auksyna ta zwiększa także akumulację jonów Ca^{2+} (Shishova, Lindberg, 2004). Powoduje również wzrost ekspresji wielu genów (Theologis, 1986; Stibon, Perrot-Rechenmann, 1997), z czym związana jest stymulacja syntezy białek (Edelman, Kutschera, 1993). Wiadomo, że IAA zwiększa ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę białek budujących kanał wpustowy K^+ (Philippari i wspóln., 1999; Becker, Hedrich, 2002), pmH^+ -ATPazę (Hager i wspóln., 1991) oraz transporter AtMHX przenoszący jony Mg^{2+} , Zn^{2+} lub Fe^{2+} do wakuoli (David-Assael i wspóln., 2006), zwiększa też zawartość Ca i Mg w pędach (Darra, Saxena, 1973). Regulator ten jest więc odpowiedzialny za pobieranie przez komórki roślinne zarówno potasu, jak i wielu innych jonów dwuwartościowych (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}). Na poziomie całych roślin lub organów IAA wpływa na wiele procesów związanych z rozwojem, różnicowaniem i wzrostem (Kurczyńska, Hejnowicz, 1991; Jankiewicz, 1997c; Karcz, Burdach, 2007; Kurczyńska i wspóln., 2007). Znany jest także wpływ IAA na zwiększanie rozwarłośc szparek i transpiracji (Zeiger, 1983; Dodd, 2003; Song i wspóln., 2006), chociaż nie powoduje on otwierania szparek zamkniętych w wyniku 3-godzinnej inkubacji w ciemności (Song i wspóln., 2006). Cytokininy i gibereliny, podobnie jak auksyny, wpływają na wiele procesów związanych ze wzrostem i rozwojem roślin oraz decydują o ekspresji licznych genów. Obie grupy fitohormonów stymulują otwieranie szparek, a co za tym idzie — zwiększają natężenie transpiracji. Ich wpływ na pobieranie 2-wartościowych jonów jest jednak w porównaniu z auksynami znacznie słabiej udokumentowany (Zeiger, 1983; Legocka,

1997; Vodnik i współpracownicy, 1999 i cytowana tam literatura; Dodd, 2003; Song i współpracownicy, 2006).

Fuzikokcyna (FC) jest toksyną wytwarzaną przez grzyb *Fusicoccum amygdalis*. Na poziomie komórkowym FC stymuluje aktywność plazmolemowej pompy protonowej ($\text{pmH}^+\text{-ATPazy}$) (Goch i współpracownicy, 1995; De Michelis i współpracownicy, 1996; Palmgren, 2001; Bunney i współpracownicy, 2002; Sondergaard i współpracownicy, 2004), wynikiem czego jest hyperpolaryzacja potencjału błonowego (Karcz, Burdach, 2007), stymulująca otwieranie wpustowych kanałów potasowych i pobieranie przez komórki jonów K^+ . Fuzikokcyna zwiększa ekspresję nielicznych, w porównaniu z auksyną, genów, które prawdopodobnie nie są bezpośrednio odpowiedzialne za transport jonów (Scott, 1992). Bardzo charakterystycznym objawem działania tej toksyny jest stymulacja otwierania szparek, nawet w ciemności, i związane z tym zwiększenie natężenia transpiracji (Zeiger, 1983; Assman, Schwartz, 1992; Jankiewicz, 1997b). Dotychczasowe badania wykazały wysoką aktywność FC zarówno w izolowanych protoplastach komórek szparkowych (Goch i współpracownicy, 1995), jak i w izolowanej epidermie liści (Squire, Mansfield, 1974; Pemadasa, 1981; Marcus i współpracownicy, 2001). Otwieraniu szparek pod wpływem FC zawsze towarzyszy intensywne pobieranie jonów K^+ przez komórki szparkowe (Squire, Mansfield, 1974), chociaż zaobserwowano także w cytoplazmie tych komórek wzrost stężenia jonów Ca^{2+} (Irving i współpracownicy, 1992). Jednak poza jonami wapnia nie stwierdzono wpływu FC na pobieranie innych jonów 2-wartościowych. Działanie tego regulatora chemicznego na całe rośliny polega na hamowaniu wzrostu liści i ich wędnięciu, co jest efektem wzrostu natężenia transpiracji (Jankiewicz, 1997b).

Kwas abscysynowy (ABA) jest fitohormonem o funkcji inhibitora wzrostu, wytwarzanym przez wszystkie organy roślin (Kubik, 1997). Na poziomie komórkowym ABA powoduje inhibicję $\text{pmH}^+\text{-ATPazy}$ oraz aktywację kanałów anionowych, w rezultacie czego dochodzi do depolaryzacji potencjału membranowego (Brault i współpracownicy, 2004). W przypadku komórek szparkowych oba wspomniane procesy powodują otwarcie kanałów wypustowych K^+ i masowy wypływ tego jonu do apoplastu, co prowadzi do zamknięcia szparek (Roelfsema, Hedrich, 2005). Hormon ten zwiększa także stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek (Irving i współpracownicy, 1992). Ponadto ABA stymuluje lub hamuje ekspresję wielu genów. Na przykład zwiększa ekspresję genu odpowiedzialnego za syntezę transportera *AtMHX*, który odpowiada za transport jonów Mg^{2+} , Zn^{2+} lub Fe^{2+} do wakuoli (David-Asael i współpracownicy, 2006). Na poziomie całych roślin lub organów ABA między innymi hamuje kiełkowanie nasion, wzrost pędów i koleoptyli traw, przyspiesza starzenie i zrzućanie organów. Jednakże zwiększa także odporność roślin na różne stresy, szczególnie na stres zasolenia i stres suszy (Larosa i współpracownicy, 1987;

Kubik, 1997). Bardzo intensywnie badano do tej pory udział ABA w regulacji rozwarcia szparek. Badania te wykazały, że ABA, w odróżnieniu od auksyn, giberelin, cytokinin i FC, powoduje zamykanie szparek, co ogranicza natężenie transpiracji (Zeiger, 1983; Heckenberger i wspólr., 1996; Blatt, Grabov, 1997; Leung, Giraudat, 1998; Dodd, 2003; Roelfsema, Hedrich, 2005).

Prowadzone dotychczas badania wpływu fitohormonów (auksyn, cytokinin, giberelin) na pobieranie metali toksycznych wykazały obniżenie ich negatywnego wpływu na wzrost, przepuszczalność błon, zawartość barwników chlorofilowych i wydajność fotosyntezy (Woźny i wspólr., 1995; Gadallah, El-Enany, 1999; Sayed, 1999; Vodnik i wspólr., 1999; Ouzonidou, Ilias, 2005; Karcz, Kurtyka, 2007). W nielicznych przypadkach potwierdzono jednak wzrost toksycznego działania metali w obecności fitohormonów (Wang i wspólr., 2007). Badania wpływu stymulatorów wzrostu na akumulację nieorganicznych form Pb lub Cd w pędach roślin przynosiły bardziej niejednoznaczne rezultaty. Na przykład cytokininy zwiększały 2-krotnie zawartość Pb w pędach *Picea abies* (Vodnik i wspólr., 1999), w przypadku *Medicago sativa* tylko w niewielkim stopniu (Łópe z i wspólr., 2007b), a nie miały żadnego wpływu na zawartość tego metalu w *Helianthus annuus* (Tassi i wspólr., 2008). W przypadku zastosowania auksyn Wang i wspólr. (2007) obserwowali obniżoną akumulację Pb w pędach *Zea mays*, podczas gdy Hadi i wspólr. (2010) w tym samym gatunku stwierdzili istotny wzrost zawartości tego metalu w częściach nadziemnych. Bardziej jednoznaczne rezultaty uzyskano z zastosowaniem ABA. Doświadczenia z różnymi gatunkami roślin traktowanymi tym inhibitorem wykazały bowiem obniżoną akumulację w pędach zarówno Cd (Rubio i wspólr., 1994; Salt i wspólr., 1995b; Hsu, Kao, 2003), jak i Pb (Xu i wspólr., 2007). Ponadto Salt i wspólr. (1995b) oraz Xu i wspólr. (2007), badając wpływ ABA na transpirację, zaobserwowali korelację między hamowaniem tego procesu przez fitohormon a obniżonym poziomem akumulacji Cd lub Pb w pędach.

Eksperymenty nad rolą regulatorów roślinnych w pobieraniu kompleksów metali z EDTA w procesie indukowanej fitoekstrakcji zostały zapoczątkowane dopiero po 2000 r. Łópe z i wspólr. (2005) w kulturach hydroponicznych *M. sativa* obserwowali istotny wzrost zawartości Pb w liściach roślin traktowanych EDTA i 10^{-4} M IAA w porównaniu z roślinami rosnącymi tylko w obecności EDTA, chociaż nie wykazano wzrostu zawartości Pb w łodygach. Następne prace tego zespołu dowiodły stymulującego wpływu kinetyny (cytokinina) (Łópe z i wspólr., 2007b) oraz mieszaniny kinetyny i IAA (Łópe z i wspólr., 2007b i 2009) na akumulację kompleksów PbEDTA w liściach *M. sativa*, przy równoczesnym braku wpływu tych regulatorów na poziom akumulacji Pb w łodygach. Wymienieni autorzy jednocześnie nie obserwowali wyższej zawartości Pb w łodygach i liściach po podaniu do pożywki EDTA

i GA₃ (giberelina) (L ó p e z i współpr., 2007b). Stymulujący wpływ IAA na akumulację Pb w pędach *Sesbania drummondii*, rosnącej w kulturach hydroponicznych w obecności EDTA, wykazali także I s r a r i S a h i (2008). Wyższą zawartość Pb w liściach *Z. mays* spryskanych roztworem IAA obserwowali również H a d i i współpr. (2010) w roślinach rosnących w glebie sztucznie zanieczyszczonej Pb, do której wprowadzono EDTA, w porównaniu z roślinami uprawianymi tylko w obecności EDTA. W odróżnieniu od L ó p e z i współpr. (2007b), autorzy ci stwierdzili także stymulujący akumulację Pb w liściach kukurydzy wpływ oprysku pędów GA₃.

Mimo że w wymienionych wcześniej eksperymentach badano wpływ regulatorów roślinnych stymulujących transpirację, w żadnym z nich nie mierzono natężenia transpiracji. Jedynie T a s s i i współpr. (2008) badali zależność między natężeniem transpiracji a poziomem akumulacji Pb i Zn w pędach *H. annuus* opryskiwanych różnymi regulatorami wzrostu. Do oprysków zastosowali preparaty Cytokin (mieszanina różnych naturalnych cytokinin) i Phytagro (mieszanina giberelin, auksyn, cytokinin, witamin i mikroelementów) oraz kinetynę. Po wprowadzeniu EDTA do gleby nie zaobserwowali wzrostu zawartości Pb w pędach słonecznika roślin opryskanych preparatem Cytokin w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Natomiast w roślinach traktowanych preparatem Phytagro lub kinetyną wykazali niższą zawartość Pb niż w roślinach kontrolnych. Jednak ze względu na wyższą suchą masę liści słonecznika opryskanego preparatem Cytokin ilość ołowiu usunięta wraz z częściami nadziemnymi była większa w porównaniu z roślinami traktowanymi tylko EDTA. Po wprowadzeniu związku chelatującego do gleby badanie transpiracji wykazało istotnie wyższe natężenie tego procesu w roślinach opryskiwanych preparatami Cytokin i Phytagro w stosunku do roślin nieopryskiwanych lub opryskanych kinetyną. Otrzymane przez T a s s i i współpr. (2008) wyniki nie dały więc jednoznacznej odpowiedzi na temat roli transpiracji w akumulacji kompleksów PbEDTA w częściach nadziemnych. Podczas gdy natężenie transpiracji w roślinach z wariantów EDTA + Cytokin i EDTA + Phytagro było istotnie wyższe od natężenia transpiracji w roślinach traktowanych tylko EDTA, zawartość Pb w pędach słonecznika była taka sama (Cytokin) lub nawet niższa (Phytagro) niż w częściach nadziemnych roślin traktowanych tylko chelatorem (T a s s i i współpr., 2008).

Zaprezentowane rezultaty wskazują, że większość opublikowanych do tej pory prac koncentrowała się na wpływie związków chelatujących oraz ich kompleksów z metalami na transpirację, natomiast wciąż za mało danych mamy na temat wpływu transpiracji na akumulację metali w pędach w trakcie fitoekstrakcji indukowanej. Po zastosowaniu chemicznych regulatorów roślinnych, w celu zwiększenia efektywności fitoekstrakcji indukowanej, albo nie oznaczano natężenia transpiracji (L ó p e z i współpr., 2005, 2007b, 2009; I s r a r , S a h i , 2008; H a d i i współpr., 2010), albo uzyskane rezultaty (T a s s i i współpr.,

2008) nie były jednoznaczne. Należy też podkreślić, że stosowane do tej pory w badaniach nad fitoekstrakcją indukowaną chemiczne regulatory roślinne (auksyny, cytokininy, gibereliny) stymulują nie tylko transpirację, ale też wiele innych procesów, w tym pobieranie jonów 2-wartościowych. Tak więc uzyskany przez niektórych autorów wzrost akumulacji Pb w pędach po zastosowaniu oprysku fitohormonami może być związany z wieloma innymi procesami, a nie tylko ze zmianami w intensywności transpiracji. Trudno zatem, nawet przy wzroście akumulacji Pb i Cd w pędach roślin traktowanych tymi fitohormonami, jednoznacznie przesądzać, że to ich wpływ na transpirację jest przyczyną hyperakumulacji metali.

Do tej pory w takich badaniach nie stosowano FC, chociaż spośród regulatorów roślinnych zwiększających transpirację związek ten stymuluje ją najsilniej. Równocześnie FC wpływa w niewielkim stopniu na inne procesy fizjologiczne, a jej działanie na poziomie całych roślin polega przede wszystkim na zwiększaniu intensywności transpiracji.

Eugeniusz Małkowski

The effect of modification of transpiration process on the efficacy of induced phytoextraction of lead and cadmium in selected plant species

S u m m a r y

The aim of this paper was to determine the relationship between transpiration and the effectiveness of induced phytoextraction of Pb and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*) and sunflower (*Helianthus annuus*) plants.

Fusicoccin (FC) at the concentration of 10^{-6} M and KCl (25—100 mM), which were sprayed on the shoots of Indian mustard, increased considerably transpiration in plants grown in hydroponic culture, both in basal medium and basal medium supplemented with EDTA, Pb and Cd. Although the total amount of transpired water was significantly greater in the treated plants when compared with control, the dynamics of transpiration varied during the experiment and depended on the composition of hydroponic solution.

In Indian mustard plants grown in the basal medium supplemented with EDTA, Pb and Cd and sprayed with FC and KCl on the above ground parts of plants a positive correlation between transpiration and the content of lead and cadmium in the shoots was observed. A significant positive relationship between the translocation of Pb and Cd and their accumulation in shoots was found 20—35 hours after spraying. In the processes of translocation and accumulation the synergistic effect of FC and KCl was observed. The investigation also showed a high positive correlation between the concentration of the KCl sprayed on the above ground parts and the content of Pb and Cd in the shoots of Indian mustard, which does not depend on transpiration.

In Indian mustard and sunflower plants grown in metal contaminated soil supplemented with EDTA no correlation between transpiration and the content of Pb and Cd in the shoots was found. The synergistic effect of FC and KCl on accumulation of Pb and Cd in the above ground parts was also not observed. Pot experiments showed that in induced phytoextraction the content of Pb and Cd is regulated by the level of induction of hyperaccumulation in plants and not by transpiration.

Investigations on induced phytoextraction of Pb and Cd showed that when the transpiration is modified discrepancies between the results obtained in experiments in hy-

droponic cultures and pot experiments can be found. For this reason pot experiments should be the main point of reference in planning field experiments.

The spraying of Indian mustard and sunflower plants with glyphosate and the application of EDTA to the Pb, Cd and Zn contaminated soil resulted in a marked increase in the Pb and Cd content in the shoots and the level of metal accumulation was similar in both investigated plant species. Moreover, it was found that glyphosate significantly increased the membrane permeability and the inductive effect of EDTA. Simultaneous application of EDTA and glyphosate resulted in apoplastic and symplastic transport of PbEDTA and CdEDTA through the endodermis. Transpiration plays a negligible role in this transport. The low membrane permeability caused by the low level of induction of metal hyperaccumulation is mainly connected with apoplastic transport of PbEDTA and CdEDTA. This transport depends on transpiration and can be modified by factors that have an effect on transpiration rate.

Eugeniusz Małkowski

Die Modifikation des Transpirationsprozesses und die Effizienz von der induzierten Phytoextraktion der Blei und des Kadmiums bei ausgewählten Pflanzenarten

Z u s a m m e n f a s s u n g

Das Ziel der Arbeit war, die Wechselbeziehungen zwischen der Transpiration und der Effizienz von der induzierten Phytoextraktion von Blei (Pb) und Kadmium (Cd) beim Braunen Senf und bei der Sonnenblume zu bestimmen.

Fusicoccin (FC) in der Konzentration von 10^{-6} M und Kaliumchlorid (KCl) (25—100 mM), die gleichzeitig zur Bespritzung der Triebe des Braunen Senfs angewandt wurden, haben sowohl im Grundnährboden, wie auch in dem EDTA, Blei und Kadmium enthaltenen Nährboden die Transpiration der hydroponisch angebauten Pflanzen wesentlich erhöht. Obwohl die Gesamtmenge des transpirierten Wassers bei behandelten Pflanzen wesentlich größer als bei Kontrollpflanzen war, war die Dynamik des Anstiegs während des Experimentes unterschiedlich, je nach der Zusammensetzung von der beim Pflanzenanbau angewandten Hydroponik.

Beim Braunen Senf, der auf dem Nährboden mit EDTA, Blei und Kadmium hydroponisch angebaut wird und dessen oberirdische Teile mit 10^{-6} M FC mit KCl bespritzt werden, beobachtete man eine positive Korrelation zwischen der Transpiration und dem Gehalt des Bleis und des Kadmiums in den Trieben. Eine deutliche positive Korrelation zwischen der Translokation von Pb und Cd und deren Akkumulation in den Trieben wurde innerhalb von den ersten 20—35 Stunden nach der Pflanzenbespritzung beobachtet. In den Prozessen wurde synergistische Wirkung von Fusicoccin und Kaliumchlorid festgestellt. Man stellte auch hohe, positive und von der Transpiration unabhängige Korrelation zwischen der Konzentration von dem zur Bespritzung gebrauchten Kaliumchlorid und dem Gehalt des Bleis und des Kadmiums in den Trieben des Braunen Senfs fest.

Bei Senf und Sonnenblume, welche in dem mit Metallen verunreinigten Boden mit dem Zusatz von EDTA angebaut wurden, wurde keine Korrelation zwischen der Transpiration und dem Gehalt von Pb und Cd in den Trieben festgestellt. Es wurde auch keine synergistische Einwirkung von Fusicoccin und Kaliumchlorid auf die Akkumulation von Pb und Cd in oberirdischen Teilen beobachtet. Aus den Erfahrungen in Blumen-

topfkulturen geht hervor, dass bei der in dem Versuchssystem induzierter Phytoextraktion das Akkumulationsniveau von Pb und Cd nicht von der Transpiration, sondern von der Induktion der Hyperakkumulation abhängt.

Die Forschungen über die induzierte Phytoextraktion von Pb und Cd haben gezeigt, dass es bei der Anwendung von den transpirationsmodifizierenden Faktoren eine gewisse Diskrepanz gab zwischen den in hydroponischen Kulturen und den in Blumentopfkulturen gewonnenen Ergebnissen. Der Bezugspunkt für die Anwendung der beschriebenen Experimente in Feldbedingungen sollten also eher die mit der Anwendung von Blumentopfkulturen durchgeführten Laborexperimente sein.

Die Bespritzung der Senf- und Sonnenblumentriebe mit Glyphosat und die Einführung von EDTA in den mit Blei, Kadmium und Zink verunreinigten Boden hatten zur Folge, dass sich der Gehalt von Pb und Cd in den Trieben erheblich vergrößerte, und das Akkumulationsniveau von Metallen war bei beiden erforschten Pflanzenarten ähnlich. Außerdem wurde Folgendes festgestellt: der Glyphosat verursacht höhere Permeabilität von den Hauten und verstärkt die induktive Wirkung von EDTA. Die gleichzeitige Applikation von EDTA und Glyphosat hat vermutlich zur Folge, dass die Komplexe PbEDTA und CdEDTA in der Wurzel über die Endodermis radial durch Apoplaste und Symplaste transportiert werden. Der Transpirationsprozess spielt dabei nur geringe Rolle. Schon eine kleine Induktion der Hyperakkumulation und die damit verbundene niedrige Permeabilität von Hauten, entscheiden über den Transport von den Komplexen PbEDTA und CdEDTA, vorwiegend durch die Apoplasten. Der Transport hängt von der Transpiration ab und kann durch die transpirationsbegünstigenden Faktoren modifiziert werden.

Redaktor: Barbara Todos-Burny
Projektant okładki: Małgorzata Pleśniar
Redaktor techniczny: Barbara Arenhövel
Korektor: Magdalena Białek

Copyright © 2011 by
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
Wszelkie prawa zastrzeżone

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-226-2020-5
(wersja drukowana)
ISBN 978-83-8012-644-2
(wersja elektroniczna)

Wydawca
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice
www.wydawnictwo.us.edu.pl
e-mail: wydawus@us.edu.pl

Wydanie I. Ark. druk. 10,0. Ark. wyd. 12,0.
Papier offset. kl. III, 90 g Cena 16 zł (+ VAT)

Łamanie: Pracownia Składu Komputerowego
Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego
Druk i oprawa: PPHU TOTEM s.c.
M. Rejnowski, J. Zamiara
ul. Jacewska 89, 88-100 Inowrocław

Eugeniusz Małkowski

Modyfikacja procesu transpiracji a efektywność indukowanej fitoekstrakcji...

Cena 16 zł
+ (VAT)

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-8012-644-2

[Kup książkę](#)