



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

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

Author: Eugeniusz Małkowski

Citation style: Małkowski Eugeniusz. (2011). Modyfikacja procesu transpiracji a efektywność indukowanej fitoekstrakcji ołowiu i kadmu w wybranych gatunkach roślin. Katowice : Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego.



Uznanie autorstwa - Użycie niekomercyjne - Bez utworów zależnych Polska - Licencja ta zezwala na rozpowszechnianie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie w celach niekomercyjnych oraz pod warunkiem zachowania go w oryginalnej postaci (nie tworzenia utworów zależnych).



UNIwersytet ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

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

Publikacja będzie dostępna — po wyczerpaniu nakładu — w wersji internetowej:

Śląska Biblioteka Cyfrowa
www.sbc.org.pl

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 „powodnią” 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 dietylotriaminopentaoctowy), 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-hydroksyetylo)iminodioctowy), związek chelatujący
IAA	— kwas indolilo-3-octowy, auksyna
NAA	— kwas naftylo-1-octowy, auksyna
NTA	— (kwas nitrylotriooctowy), 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 (K a b a t a - P e n d i a s, P e n d i a s, 1999). W przypadku naturalnych źródeł stężenia metali w glebach z reguły nie są wysokie i nie stanowią zagrożenia dla organizmów żywych (R o s s, 1994a; K a b a t a - P e n d i a s, P e n d i a s, 1999). Takie ilości metali w glebach z obszarów słabo lub niezanieczyszczonych w wyniku działalności człowieka uznawane są za naturalne i określane jako tła 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 (T e r e l a k i w s p ó ł p r., 1997a; K a b a t a - P e n d i a s, P e n d i a s, 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 (K a r c z e w s k a i w s p ó ł p r., 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 (E r n s t, 1990; R o s t a ń s k i, 1997; B r e j, 1998; G r o d z i ń s k a i w s p ó ł p r., 2000; R e e v e s, B a k e r, 2000; S z a r e k - Ł u k a s z e w s k a, N i k l i ń s k a, 2002; W i e r z b i c k a, R o s t a ń s k i, 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 (K u c h a r s k i i w s p ó ł p r., 1994; R o s s, 1994a; T e r e l a k i w s p ó ł p r.,

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; Drażkiewicz 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 (Ferguson, 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, witrifikacja, 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). Witrifikacja (ang. *vitriification*) 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 współpracownicy, 2001a i b; Sidoli O'Connor i współpracownicy, 2003). Przemycanie gleby (ang. *soil washing*) związane jest z przepuszczaniem przez glebę roztworów, które przeprowadzają nierozpuszczalne formy metali do roztworu przemycającego. 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 przemycania. Niewątpliwym plusem przemycania gleby jest wysoka skuteczność tej metody w usuwaniu wielu metali ciężkich (Fristad i współpracownicy, 1996; Ghestem, Bermond, 1998; Wasay i współpracownicy, 1998; Vangronsveld, Cunningham, 1998; Mulligan i współpracownicy, 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 (Dushenko i współpracownicy, 1997a; Blaylock, 2000). Ostatnio zastosowano ją także na terenie Francji, gdzie, zdaniem autorów, okazała się jednak nieskuteczna (Douay i współpracownicy, 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 współpracownicy, 1997; Flathman, Lanza, 1998; Salt i współpracownicy, 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. Cheria n i Olive ira (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 niemetalami, 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; Jayawera 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 współpracownicy, 1997; Cherian, Oliveira, 2005; Pilon-Smits, 2005). Rośliny pobierają z gleby pierwiastki 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 współpracownicy, 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 współpracownicy, 2000). W języku polskim pojawiło się kilka terminów (fitowolatilizacja, fitoewaporacja, fitoodparowanie) nazywających tę metodę fitoremediacji. Spośród nich tylko pojęcie „fitoodparowanie” (Karczevska, 2003; Marcik i współpracownicy, 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 współpracownicy, 2000a).

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

i współpr., 1997; Berti, Cunningham, 2000; Cherian, Oliveira, 2005). Innymi stosowanymi w tym celu pojęciami są: *phytoremediation*, *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 wspópr., 2004; Kucharski i wspópr., 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 górnią, 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 wspópr., 2000a i b; Laperche, 2000; Mench i wspópr., 2000; Ciecicko i wspópr., 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 wspópr., 2000; Laperche, 2000; Shu i wspópr., 2002; Theodoratos i wspópr., 2002; Knox i wspópr., 2003; Brown i wspópr., 2004; Schreckel, Ryan, 2004; Kucharski i wspópr., 2005; Panfili i wspópr., 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 wspópr., 2001) lub superfosfatu potrójnego, składającego się głównie z $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ (Brown i wspópr., 2004; Kucharski i wspópr. 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 wspópr., 2003; Brown i wspópr., 2004; Schreckel, Ryan, 2004). Wyraźne obniżenie biodostępności i akumulacji w roślinach Pb, Cd i Zn zaobserwowano także po wprowadzeniu do gleby H_3PO_4 (Brown i wspópr., 2004; Schreckel, Ryan, 2004; Geebelen i wspópr., 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; Boulroos 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 MENCHĄ 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 (MENCHĄ 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 w s p ó ł p r., 1998; K e l l e r i w s p ó ł p r., 2005b), jak i w wypadku równoczesnej immobilizacji Pb, Cd, Zn i Cu (G w o r e k i w s p ó ł p r., 1996; K n o x i w s p ó ł p r., 2003; M a d r i d i w s p ó ł p r., 2006; S z á k o v á i w s p ó ł p r., 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 w s p ó ł p r., 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 w s p ó ł p r., 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 w s p ó ł p r., 1995, 1996). Dużą jego skuteczność w immobilizacji metali potwierdziły także dalsze badania, zarówno laboratoryjne, jak i polowe (L o m b i i w s p ó ł p r., 2002; M e n c h i w s p ó ł p r., 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 w s p ó ł p r., 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 w s p ó ł p r. (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 w s p ó ł p r. (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 w s p ó ł p r. (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, Kramer, 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 hyperakumulatora 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 połowe 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; Fischerová 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; Kramer, 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; Gissbert 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-karboxyowego (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 współpracownicy, 2006). W rezultacie więc lepszą efektywnością fitoekstrakcji charakteryzowała się inokulowana bakterią 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 współpracownicy, 2003a i b), inni opisywali zwiększoną odporność, przy równoczesnym braku wzmożonej akumulacji w pędach (Pomponi i współpracownicy, 2006; Wawrzyński i współpracownicy, 2006; Gasic, Korban, 2007) lub stwierdzali wzrost zarówno tolerancji, jak i akumulacji metali (Gisbert i współpracownicy, 2003; Martinez i współpracownicy, 2006). Rozbieżności w otrzymanych wynikach mogły być związane z różnym pochodzeniem transgenów, co potwierdzili Wojas i współpracownicy (2008), uzyskując linie *Nicotiana tabacum* z wbudowanym genem syntazy fitochelatynowej (*AtPCSI*) 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 współpracownicy, 2008).

Gisbert i współpracownicy (2003) oraz Martinez i współpracownicy (2006), wprowadzając gen syntazy fitochelatynowej z pszenicy (*TaPCSI*) 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 współpracownicy, 2006). Zawartości Pb i Cd w pędach roślin były niskie w porównaniu z koncentracją tych metali w glebie (Martinez i współpracownicy, 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 współpracownicy (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 współpracownicy (2007) uzyskali linie *Nicotiana tabacum*, wykazujące nadekspresję wspomnianego

geny. 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.

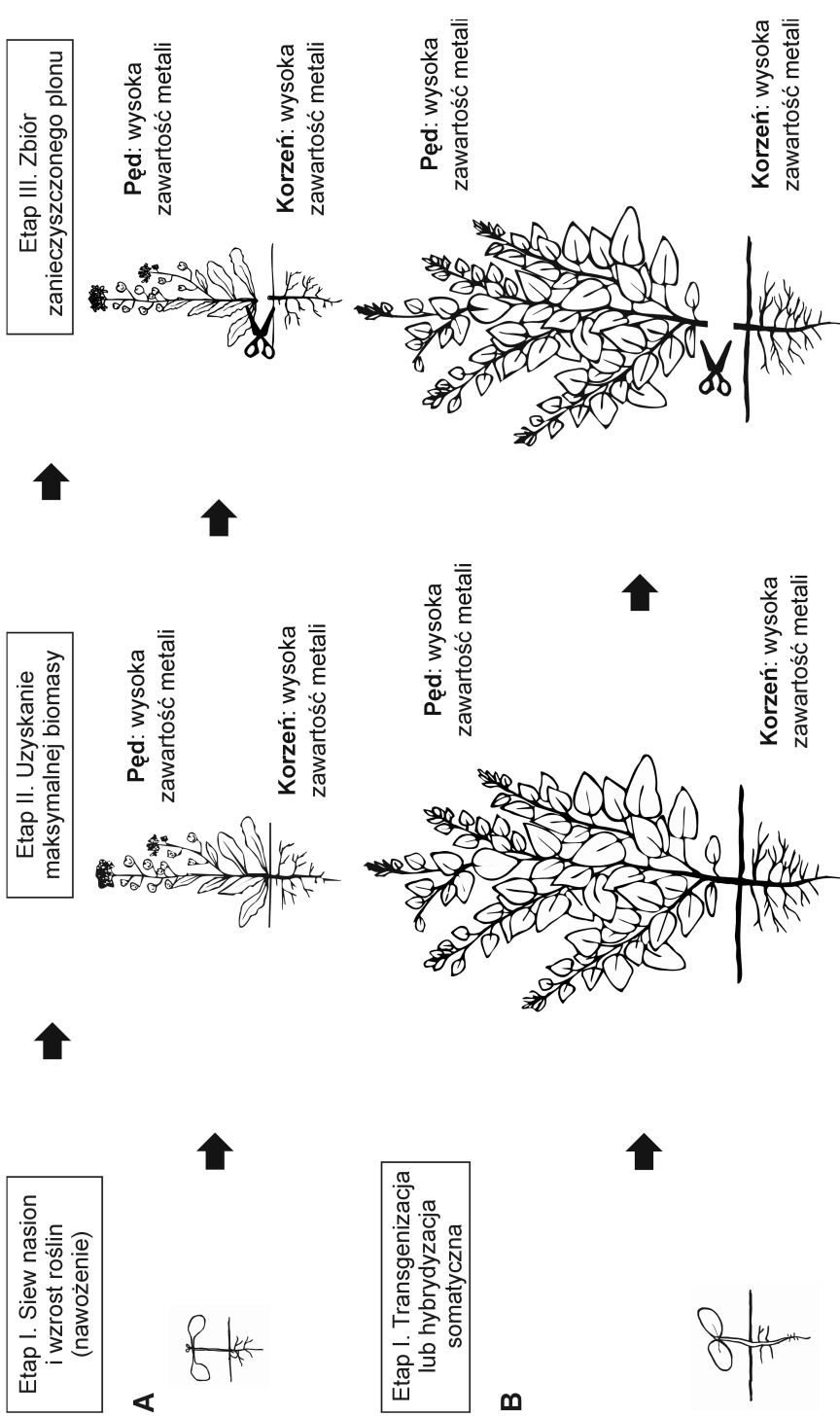
Przebieg w warunkach polowych fitoekstrakcji ciągłej z zastosowaniem hyperakumulatorów schematycznie można przedstawić w następujący sposób (rys. 1A):

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 biomacie (np. *Nicotiana glauca*)

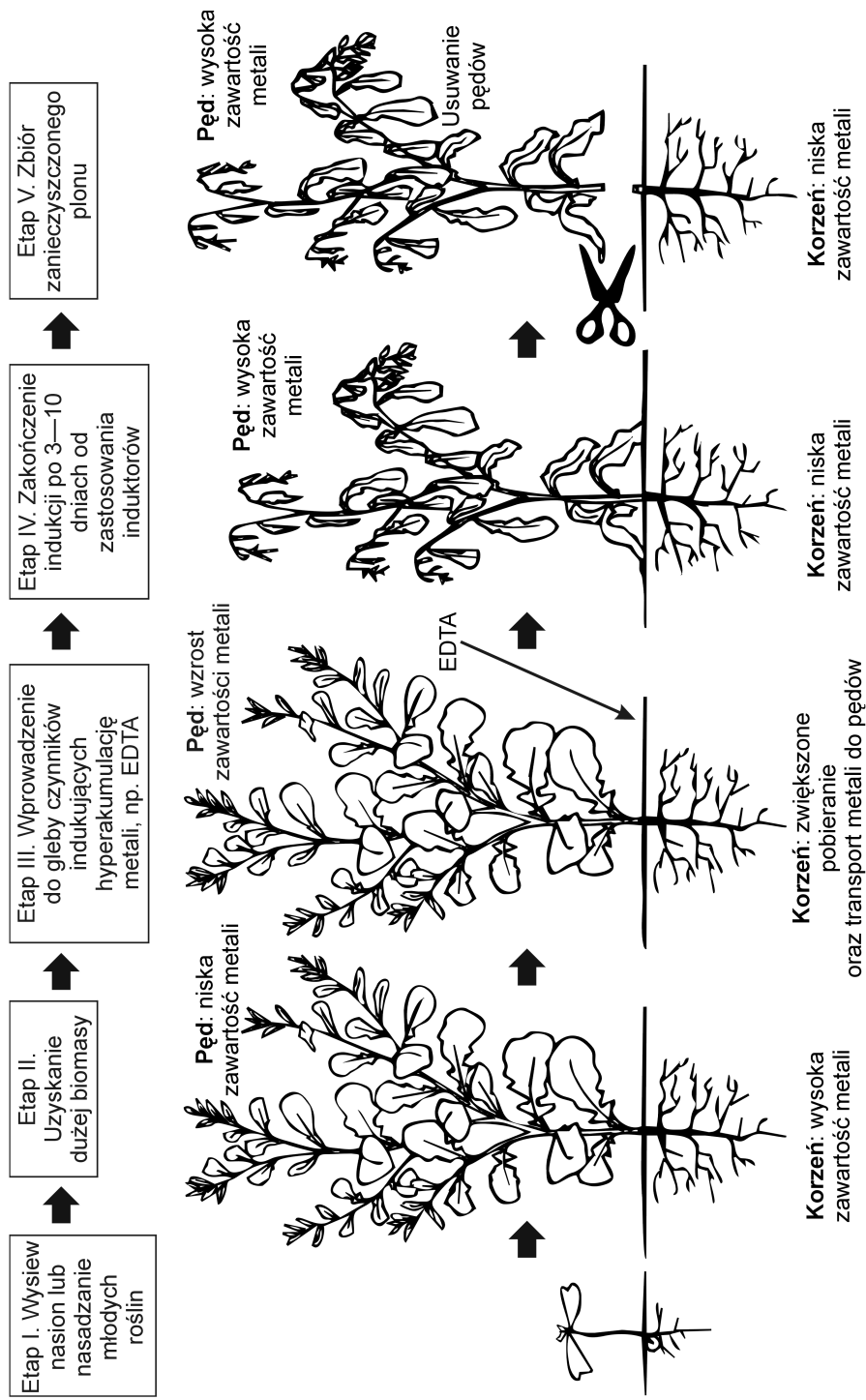
dukowaną fitoekstrakcją metali. Schematyczny przebieg fitoekstrakcji indukowanej przedstawia rys. 2.

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 niezmienną.
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 zwiędnięte 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 hyperakumulatorami (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'-etylenodiaminodibursztynowy (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-cykloheksylenodinitri- lo-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 transpi-
rację, wędnięcie, chlorozę i nekrozy liści, a w rezultacie zasychanie całych ro-
ślin (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, więdnienie 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, naprawdę 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; Kosileštan, 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; Delétage-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 kłaczy 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 endogenego ABA i IAA, w jednych gatunkach zwiększając, a w przypadku innych zmniejszając stężenie tych fitohormonów

(Rajasekaran i wspópr., 1987 i cytowana tam literatura). Hamuje bazy-petalny transport auksyny (Baur, 1979), proces fotosyntezy oraz zmienia dystrybucję substancji pokarmowych (Sprankle i wspópr., 1975; Geiger i wspópr., 1986; Servaites i wspópr., 1987; Shieh i wspópr., 1991; Fuchs i wspópr., 2002), co między innymi zakłóca wzrost roślin (Baur i wspópr., 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 wspópr., 1986; Muñoz-Rueda i wspópr., 1986; Fuchs i wspópr., 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 wspópr., 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 wspópr., 2002; Krämer i wspópr., 2007; Verbruggen i wspópr., 2009; Verkleij i wspópr., 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 Blylock i wspópr. (1997) stwierdzili zawartość Pb przekraczającą 10 000 mg/kg s.m. w pędach gorczycy sarepskiej po podaniu do gleby EDTA w ilości 5 mmoli/kg lub 10 mmoli/kg. Huang i wspópr. (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, asparginowy, 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 współpr., 1997a; C h e n i współpr., 2004b), *Pisum sativum* (H u a n g i współpr., 1997; C h e n i współpr., 2007), *Phaseolus vulgaris* (L u o i współpr., 2005, 2007), *Vetiveria zizanioides* (C h i u i współpr., 2005) i *Helianthus annuus* (K a y s e r i współpr., 2000; C h e n i współpr., 2004b; M e e r s i współpr. 2005). Ponadto C h e n i współpr. (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 współpr., 2006), *Chrysanthemum coronarium* (L u o i współpr., 2006d), *Lactuca sativa* (K u l i i współpr., 1999), *Raphanus sativus* (C h e n i współpr., 2003), *Dianthus chinensis* (L a i i współpr., 2007), *Prosopis* spp. (A l d r i c h i współpr., 2004), *Halimione*

portulacoides (D u a r t e i w s p ó ł p r . , 2007), *Silene vulgaris* (N a d g ó r s k a - S o c h a i w s p ó ł p r . , 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 (A l k o r t a i w s p ó ł p r . , 2004; N o w a c k i w s p ó ł p r . , 2006; E v a n g e l o u i w s p ó ł p r . , 2007; L e ś t a n i w s p ó ł p r . , 2008; S a i f u l l a h i w s p ó ł p r . , 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*) (S a i f u l l a h i w s p ó ł p r . , 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 (B l o o m , 2006), rzadziej jonów kompleksowych (R o s s , 1994b; W e l c h , N o r v e l l , 1999), dlatego roztwór glebowy jest ich bezpośrednim źródłem (J u n g k , 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 (J u n g k , 2002). Może on zachodzić nawet w przypadku martwych organów (R o s s , K a y , 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 (M a r s c h n e r , 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 Caspari'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 wspópr., 2007; Antosiewicz i wspópr., 2008; Verbruggen i wspópr., 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 wspópr., 2008). W przypadku Cd stwierdzono, że metal ten jest transportowany przez plazmolemę systemami transportującymi Fe i Zn (Verkleij i wspópr., 2009) lub Ca (Perfuss-Barbeoch i wspópr., 2002). Znacznie mniej wiadomo na temat pobierania Pb przez komórki roślin. Wyniki uzyskane przez Arziego i wspópr. (1999) oraz Sun kara i wspópr. (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 wspópr., 2007; Verbruggen i wspópr., 2009) lub systemy transportowe NRAMP (Verkleij i wspópr., 2009). Może być także pobierany przez nośniki uniportowe ZIP (ZNT1), specyficzne dla Zn (Krämer i wspópr., 2007; Antosiewicz i wspópr., 2008; Verbruggen i wspópr., 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 (Cd^{2+}/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 endodermy. 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 symplacie, były komórki endodermy 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 apoplaście 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 symplacie 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 współpracownicy, 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 współpracownicy, 1997; Vassil i współpracownicy, 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 współpracownicy, 2001; Sarret i współpracownicy, 2001; Bell i współpracownicy, 2003; Schaidler i współpracownicy, 2006) można przypuszczać, że kompleksy metali z EDTA przemieszczają się do walca osiowego wyłącznie drogą apoplastyczną (Nowack i współpracownicy, 2006; Hernandez-Allica i współpracownicy, 2007; Leštan i współpracownicy, 2008) lub apoplastyczną i symplastyczną (Chaney i współpracownicy, 2007; Meers i współpracownicy, 2008; Saifullah i współpracownicy, 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 współpracownicy (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 współpracownicy (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 współpracownicy (1999) obserwowali brak bezpośredniej zależności między transpiracją a akumulacją Pb w pędach gor-

czyści 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 fuzikokocynę (Janekiewicz, 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 wspólr., 2002), powodując w ten sposób hyperpolaryzację potencjału błonowego (Felle i wspólr., 1991; Karcz, Burdach, 2007), dzięki czemu dochodzi do zwiększonego pobierania jonów K^+ (Blatt, Thiel, 1993; Claussen i wspólr., 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 wspólr., 1999; Becker, Hedrich, 2002), pmH^+ -ATPazę (Hager i wspólr., 1991) oraz transporter AtMHX przenoszący jony Mg^{2+} , Zn^{2+} lub Fe^{2+} do wakuoli (David-Assael i wspólr., 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; Janekiewicz, 1997c; Karcz, Burdach, 2007; Kurczyńska i wspólr., 2007). Znany jest także wpływ IAA na zwiększanie rozwarości szparek i transpiracji (Zeiger, 1983; Dodd, 2003; Song i wspólr., 2006), chociaż nie powoduje on otwierania szparek zamkniętych w wyniku 3-godzinnej inkubacji w ciemności (Song i wspólr., 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 — zwiększając 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 plazmolewowej pompy protonowej (pmH⁺-ATPazy) (Goch i współpracownicy, 1995; De Michellis 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 Ca²⁺ (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 więdnieniu, 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 pmH⁺-ATPazy oraz aktywację kanałów anionowych, w rezultacie czego dochodzi do depolaryzacji potencjału membranowego (Braulot 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 Ca²⁺ 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 Mg²⁺, Zn²⁺ lub Fe²⁺ do wakuoli (David-Assael 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 współprac., 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 współprac., 1995; Gadallah, El-Enany, 1999; Sayed, 1999; Vodnik i współprac., 1999; Ouzonidou, Ilias, 2005; Karcz, Kurtyka, 2007). W nielicznych przypadkach potwierdzono jednak wzrost toksycznego działania metali w obecności fitohormonów (Wang i współprac., 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 współprac., 1999), w przypadku *Medicago sativa* tylko w niewielkim stopniu (López i współprac., 2007b), a nie miały żadnego wpływu na zawartość tego metalu w *Helianthus annuus* (Tassi i współprac., 2008). W przypadku zastosowania auksyn Wang i współprac. (2007) obserwowali obniżoną akumulację Pb w pędach *Zea mays*, podczas gdy Hadi i współprac. (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 współprac., 1994; Salt i współprac., 1995b; Hsu, Kao, 2003), jak i Pb (Xu i współprac., 2007). Ponadto Salt i współprac. (1995b) oraz Xu i współprac. (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. López i współprac. (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) (López i współprac., 2007b) oraz mieszaniny kinetyny i IAA (López i współprac., 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 (mieszanka różnych naturalnych cytokinin) i Phytagro (mieszanka 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, gibereline) 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 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.

2. Cel badań

Celem badań była weryfikacja hipotezy roboczej zakładającej, że intensywność transpiracji jest głównym czynnikiem decydującym o poziomie akumulacji Pb i Cd w pędach roślin, a co za tym idzie o efektywności fitoekstrakcji indukowanej. Przyjmując tę hipotezę, założono, że traktowanie pędów roślin związkami chemicznymi zwiększającymi (FC, KCl) lub zmniejszającymi transpirację (ABA), w obecności w podłożu związku indukującego hyperakumulację (EDTA), powinno odpowiednio podwyższać lub obniżać akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych roślin. Oprócz EDTA, jako dodatkowy czynnik indukujący hyperakumulację metali zastosowano glifosat. Eksperymenty prowadzono w kulturach hydroponicznych, doświadczeniach wazonowych oraz w badaniach na poziomie tkankowym.

Założeniem doświadczeń w kulturach hydroponicznych było określenie bezpośrednich zależności między transpiracją a akumulacją Pb i Cd w pędach roślin indukowanych do hyperakumulacji przez dodanie do pożywki EDTA. W tych doświadczeniach, w celu zwiększenia transpiracji, stosowano fuzikokcyne (FC), regulator roślinny silnie stymulujący otwieranie szparek i transpirację. Ponieważ otwieraniu szparek pod wpływem FC towarzyszy intensywne pobieranie jonów K^+ , równocześnie z fuzikokcyne traktowano rośliny różnymi stężeniami KCl.

Badania wazonowe prowadzono, kierując się wynikami eksperymentów w kulturach hydroponicznych, w których wykazano dodatnią korelację zarówno między transpiracją a akumulacją Pb i Cd w pędach roślin traktowanych FC + KCl, jak również między zawartością metali w pędach a stężeniem KCl. Celem tych badań było sprawdzenie, czy traktowanie pędów związkami stymulującymi transpirację (FC, FC + KCl) lub samym KCl, w warunkach bez lub w obecności EDTA w glebie, zwiększa akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych roślin uprawianych w zanieczyszczonej metalami glebie. Zbadano także wpływ traktowania pędów ABA oraz glifosatem (Glif). ABA stosowano jako regulator roślinny powodujący zamykanie szparek i hamowanie transpiracji, przypuszczano więc, że efektem jego działania będzie zmniejszenie pobierania i akumulacji Pb i Cd w częściach nadziemnych. Glifosat użyto jako do-

datkowy czynnik indukujący hyperakumulację metali, co mogło zwiększać efektywność EDTA.

Badania na poziomie tkankowym miały na celu sprawdzenie, czy EDTA i glifosat stymulują pobieranie Pb przez komórki roślin i jego akumulację w symplaście, czy też powodują odkładanie tego metalu w apoplaście. W trakcie badań wazonowych oba związki chemiczne bardzo silnie stymulowały akumulację Pb i Cd w pędach roślin. Ponieważ poziom akumulacji metali był podobny, badania na poziomie tkankowym przeprowadzono wyłącznie dla ołowiu. Oprócz zawartości Pb, w tkankach określono także zawartość K i Ca. Potas pobierany jest przez komórki roślinne i akumulowany przede wszystkim w symplaście, natomiast wapń akumulowany jest zarówno w apoplaście, jak i w symplaście. Ponadto zmniejszenie zawartości K w tkankach mogłoby wskazywać na wypływ tego pierwiastka z komórek (symplastu), świadcząc o uszkodzeniu błon i zwiększeniu ich przepuszczalności.

3. Materiał i metody

3.1. Doświadczenia w kulturach hydroponicznych i doświadczenia wazonowe

3.1.1. Materiał roślinny

Eksperymenty prowadzono z dwoma gatunkami roślin uprawnych: gorczycą sarepską i słonecznikiem zwyczajnym. Nasiona gorzycy sarepskiej (*Brassica juncea* 'Phyto 426') zostały dostarczone przez amerykańską firmę Phytotech Inc., zajmującą się w USA wdrażaniem fitoremediacji na skalę komercyjną, w ramach projektu *Integrated approach to the remediation of heavy metal contaminated land*. Projekt był finansowany przez Departament Energetyki USA (DoE) i koordynowany przez Florida State University (koordynator dr Mike Kuperberg), a realizowany przez Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych (IETU) w Katowicach w latach 1997—2001. Kultywar zaproponowany przez partnera amerykańskiego (Phyto 426) miał być jednym z najefektywniejszych spośród ponad 100 przebadanych przez Phytotech Inc. Ponieważ fitoremediacja jest procesem długotrwałym, w czasie jej trwania konieczne jest stosowanie płodozmianu. Z tego też względu, oprócz badań na gorzycy, będącej przedstawicielem rodziny *Brassicaceae*, prowadzono eksperymenty na słoneczniku (*Helianthus annuus* 'Lech'), który należy do rodziny *Asteraceae*. O wyborze tego gatunku zdecydowały wyniki wcześniejszych badań, prowadzonych na podłożu z mieszaniną piasku i perlitu lub na glebie sztucznie zanieczyszczonej Pb (K u m a r i współpr., 1995; C h e n i współpr., 2004b). Wykazano w nich wysoką akumulację Pb w pędach słonecznika w porównaniu z kukurydzą i tytoniem. Ponadto przydatność słonecznika do indukowanej fitoekstrakcji potwierdziły badania własne na glebie pochodzącej z okolic huty cynku i ołowiu (K u c h a r s k i i współpr., 1998).

3.1.2. Doświadczenia w kulturach hydroponicznych

Celem eksperymentów w kulturach hydroponicznych było określenie wpływu różnych stężeń fuzikokcyny (FC) i KCl na transpirację oraz akumulację Pb i Cd w pędach gorzycy sarepskiej. Doświadczenia prowadzono zarówno w pożywce zawierającej makro- i mikroelementy (pożywka podstawowa, bez Pb, Cd i EDTA), jak również w pożywce podstawowej zawierającej dodatkowo EDTA, Pb, Cd i podwyższone stężenie Zn (pożywka EDTA/Pb/Cd/Zn). Rośliny uprawiano w pożywce podstawowej, aby stwierdzić, jak FC i KCl wpływają na transpirację i akumulację w częściach nadziemnych pierwiastków o funkcjach fizjologicznych (K, Ca, Zn). Celem uprawy roślin w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn było określenie zależności między transpiracją modyfikowaną przez FC i KCl a zawartością w pędach Pb, Cd, K, Ca i Zn po indukcji hyperakumulacji Pb i Cd w gorzycy przez EDTA. Dodatkową ilość cynku wprowadzono do pożywki EDTA/Pb/Cd/Zn, ponieważ w glebach zanieczyszczonych w wyniku działalności hut i kopalń cynku i ołowiu występują podwyższone zawartości nie tylko Pb i Cd, ale także Zn (Kucharski i współpr., 2005; Cabała, Teper, 2007; Gucwa-Przepióra i współpr., 2007).

Jako czynnik stymulujący transpirację zastosowano fuzikokcynę (FC), regulator roślinny silnie stymulujący otwieranie szparek i transpirację, także w ciemności (Zeiger, 1983; Assman, Schwartz, 1992; Jankiewicz, 1997b). Otwieraniu szparek w ogóle, a szczególnie pod wpływem FC, towarzyszy intensywne pobieranie jonów K^+ przez komórki roślin (Squire, Mansfield, 1974; Pemadasa, 1982; Sondergaard i współpr., 2004; Roelfsema, Hedrich, 2005). W związku z tym, razem z fuzikokcyną, podawano różne stężenia KCl, aby spotęgować działanie FC. Zbadano także wpływ samego KCl na transpirację i akumulację Pb i Cd, aby móc rozdzielić efekt wywołany podaniem FC od efektu spowodowanego wyłącznie podaniem soli potasowej. O zastosowaniu KCl zdecydowały także badania wstępne autora, które wykazały, że po wprowadzeniu EDTA do gleby opryskanie pędów roztworem 25 mM KCl zwiększyło akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych gorzycy sarepskiej w stosunku do roślin kontrolnych (Małkowski i współpr., 1997).

W fitoekstrakcji indukowanej konieczne jest zastosowanie związku indukującego w roślinach hyperakumulację metali. Najczęściej dotychczas stosowanym (por. tabela 1), a zarazem najbardziej efektywnym związkiem był EDTA (Raskin i współpr., 1997; Salt i współpr., 1998; Schmidt, 2003). W związku z tym w badaniach w kulturach hydroponicznych stosowano sól dwupotasową EDTA (K_2EDTA).

Zawartość wapnia i potasu w pędach oznaczano z uwagi na różny sposób ich transportu radialnego do walca osiowego. Podczas gdy wapń przemieszcza

się do walca osiowego zarówno drogą apoplastyczną, jak i symplastyczną (White, 2001), potas jest transportowany przede wszystkim symplastem (Marschner, 1995). Z tego powodu natężenie transpiracji ma duży wpływ na zawartość Ca i niewielki na zawartość K w pędach roślin (Marschner, 1995). Ponadto ocena akumulacji Zn i Ca była istotna, ponieważ błonowe systemy transportujące jony Zn^{2+} lub Ca^{2+} również umożliwiają wnikanie do komórki Cd (Hall, Williams, 2003; Krämer i współpr., 2007; Verkleij i współpr., 2009), a w niektórych przypadkach także Pb (Huang, Cunningham, 1996; Sunkar i współpr., 2000; Antosiewicz, 2005). Określenie zawartości tych pierwiastków (K, Ca, Zn) w pędach gorczycy miało dać odpowiedź na pytanie, czy w trakcie fitoekstrakcji indukowanej akumulacja Pb i Cd w częściach nadziemnych roślin przebiega podobnie jak akumulacja pierwiastków o funkcjach fizjologicznych.

3.1.2.1. Uprawa roślin

Badania hydroponiczne prowadzono na gorczycy sarepskiej 'Phyto 426'. Nasiona gorczycy wysiano do plastikowych kuwet wyłożonych 4 warstwami bibuły filtracyjnej, silnie zwilżonej wodą dejonizowaną. Kuwety przykryto szczelnie przezroczystą folią i pozostawiono w świetle. Po 5 dniach, gdy niemal wszystkie nasiona wykiełkowały, wybrano 400 siewek o długości korzeni 1,5—2,0 cm i przeniesiono do 4 szklanych zbiorników hydroponicznych napełnionych 25 l pożywki, którą stosowano w uprawie gorczycy sarepskiej we wcześniejszych badaniach (Blaylock i współpr., 1997). Skład pożywki (tzw. pożywka podstawowa) był następujący (mg/l): 151,7 KNO_3 ; 164,1 $Ca(NO_3)_2$; 28,7 $NH_4H_2PO_4$; 60,19 $MgSO_4$; 0,71 H_3BO_3 ; 0,02 $CuSO_4$; 0,004 MoO_3 ; 0,45 $MnCl_2$; 0,055 $ZnSO_4$. Winian żelaza $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$ w ilości 2,66 mg/l zastąpiono 2,517 mg $FeC_6H_5O_7 \times H_2O/l$ (cytrynian żelaza). Pożywka w zbiornikach była ciągle napowietrzana za pomocą pomp akwariowych. Na ściany zbiorników szklanych nałożono osłony nieprzepuszczające światła, aby uniemożliwić rozwój glonów. Pożywkę wymieniano w całości 2 razy w tygodniu, a jej wyjściowe pH (5,9—6,1) ustalano za pomocą 1 M NaOH lub HCl. Taki odczyn wyjściowy pożywki wybrano na podstawie wyników obserwacji własnych, które wykazały, że charakteryzuje się ona największymi właściwościami buforowymi w tym przedziale pH. Wzrost roślin w kulturach hydroponicznych trwał 16 dni i prowadzony był w hali wegetacyjnej niemającej klimatyzacji. Rośliny rosły przy średniej temperaturze powietrza 20,5°C/19,5°C (dzień/noc) oraz średniej wilgotności powietrza 52%/48% (dzień/noc). Fotoperiod ustalono na 16/8 godzin (dzień/noc), korzystając ze światła naturalnego

oraz z lamp sodowych (Philips, SON-TAGRO 400). Lampy sodowe emitowały światło o średnim natężeniu 12 500 lux.

3.1.2.2. Traktowanie roślin fuzikokcyną (FC) i KCl oraz pomiar transpiracji

Aby zwiększyć transpirację, pędy roślin były opryskiwane FC i/lub KCl. Stężenia FC (10^{-7} i 10^{-6} M) oraz KCl (1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM) wybrano, biorąc pod uwagę badania nad mechanizmem otwierania szparek prowadzone na izolowanej epidermie lub całych liściach (Squire, Mansfield, 1974; Pemadasa, 1981; Assman, Schwartz, 1992; Gehring i współpr., 1998; Baully i współpr., 2000; Song i współpr., 2006), jak również prace dotyczące działania obu związków na fragmenty tkanek lub całe rośliny (Gazizov i współpr., 1995; Watanabe, Takahashi, 1997; Karcz, Burdach, 2007). W przypadku KCl na tak szeroki zakres stężeń miały też wpływ wyniki wcześniejszych badań autora, które wykazały zwiększoną akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych gorczycy sarepskiej po opryskaniu pędów 25 mM KCl. W związku z tym w badaniach hydroponicznych uwzględniono zarówno stężenia niższe, jak i wyższe od 25 mM.

Po 16 dniach uprawy w pożywce podstawowej do dalszych badań wybrano 156 jednakowych roślin, które przenoszono pojedynczo do szklanych probówek Egerta, umieszczając w całości ich system korzeniowy w probówce. Siedemdziesiąt osiem probówek zawierało po 18 ml pożywki podstawowej. Kolejne 78 probówek zawierało pożywkę podstawową z dodatkiem (μM): 750 K_2EDTA , 500 PbCl_2 , 25 CdCl_2 oraz 25 ZnCl_2 (tzw. pożywka EDTA/Pb/Cd/Zn). Stężenie Pb i EDTA wybrano na podstawie rezultatów uzyskanych przez Vassila i współpr. (1998). Autorzy ci zaobserwowali w kulturach hydroponicznych najwyższą akumulację Pb w pędach gorczycy sarepskiej po wprowadzeniu do pożywki EDTA w stężeniu 750 μM . Wyższe i niższe stężenia EDTA zmniejszały pobieranie Pb przez pędy gorczycy. Stężenie Cd w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn dobrano tak, by uzyskać wysoką akumulację tego metalu bez wyraźnych fitotoksycznych efektów. Kadm w stężeniach 10–100 μM , w przypadku roślin niebędących hiperakumulatorami, stosowali również inni autorzy (np. Larki i współpr., 2002). W związku z tym, że w glebach zanieczyszczonych w wyniku działalności hut i kopalń cynku i ołowiu występują podwyższone stężenia Zn (Rieuwertse i współpr., 1999; Cabała i współpr., 2009; Aleksander-Kwaterczak, Helios-Rybińska, 2009), zdecydowano się wprowadzić do pożywki dodatkową ilość tego metalu w postaci ZnCl_2 (25 μM). Wyjściowe pH zarówno pożywki podstawowej, jak

i pożywki EDTA/Pb/Cd/Zn ustalano w przedziale 5,6—5,9. Zakres pH wybrano na podstawie, obserwowanego wielokrotnie przez autora, wytrącania się Pb z roztworów o pH powyżej 6,1, niezależnie od rodzaju stosowanej soli ołowiu i obecności innych jonów (M a ł k o w s k i, 1993).

Po przeniesieniu roślin do próbek zakrywano ich otwory kawałkami folii aluminiowej, aby ograniczyć ewaporację do minimum. Następnie ważono każdą próbkę z dokładnością do 0,001 g. Wodą dejonizowaną spryskiwano pędy dwóch grup roślin: kontrolnych (kontrola), rosnących w pożywce podstawowej, oraz roślin z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn, rosnących w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn. Pozostałe rośliny traktowano roztworami zawierającymi: różne stężenia KCl (1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM), różne stężenia KCl (1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM) i 10^{-6} M FC lub różne stężenia KCl (1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM) i 10^{-7} M FC (tabela 3). Objętość oprysku wynosiła 10 ml; wprowadzano do niego 1 kroplę detergentu Tween 20, w celu zmniejszenia napięcia powierzchniowego, co zapewniało równomierne pokrycie roztworem całej rośliny. Ostatecznie zarówno rośliny znajdujące się w pożywce podstawowej, jak i będące w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn spryskiwano 18 różnymi kombinacjami roztworów, co dało łącznie 36 wariantów eksperymentalnych oraz kontrolę i wariant EDTA/Pb/Cd/Zn. Wykaz wszystkich wariantów eksperymentalnych prezentuje tabela 3. Łącznie użyto 156 roślin, po 4 w wariantach eksperymentalnych i po 6 w kontroli oraz wariantcie EDTA/Pb/Cd/Zn. Ostateczna liczba analizowanych roślin była jednak mniejsza, ponieważ niektóre z nich uległy uszkodzeniu w trakcie kolejnych ważeń i zostały wyeliminowane z eksperymentu. Po opryskaniu roślin próbki wkładano do odpowiednio przygotowanych płyt styropianowych, zainstalowanych na wytrząsarkach, które zapewniały mieszanie się i napowietrzanie roztworów w próbkach. Wytrząsarki z roślinami znajdowały się w tej samej hali wegetacyjnej, w której prowadzono uprawę hydroponiczną.

Transpirację oceniano metodą wagową, na podstawie ubytku wody z próbek z roślinami, i przedstawiono w ml H_2O/g ś.m. pędów. Po umieszczeniu roślin w próbkach zakrywano ich otwory kawałkami folii aluminiowej, ograniczając tym samym ewaporację do minimum. Następnie, przed opryskiwaniem roślin FC i KCl, ważono każdą próbkę z dokładnością do 0,001 g. W celu określenia ilości wytranspirowanej wody próbki z roślinami ważono po 3 (14^{15}), 7 (18^{15}), 11 (22^{15}), 19 (6^{15}), 25 (12^{15}), 31 (18^{15}), 35 (22^{15}), 43 (6^{15}) i 49 (12^{15}) godzinach od momentu traktowania roślin. Po ważeniu uzupełniano ubytki roztworu w próbkach odpowiednią pożywką, do uzyskania wyjściowej wagi. Po 49 godzinach rośliny usuwano z próbek, płukano 3-krotnie wodą dejonizowaną i osuszano dokładnie bibułą filtracyjną. Odcinano część nadziemną od systemu korzeniowego i oznaczano świeżą masę pędów. Następnie pakowano materiał roślinny w papier i suszono w suszarce w temperaturze $70^{\circ}C$ przez 3 dni, do uzyskania suchej masy.

Tabela 3

Warianty doświadczenia w kulturach hydroponicznych

Wariant doświadczenia	Rodzaj pożywki	Związki chemiczne, którymi opryskiwano pędy		
		woda dejonizowana	fuzikokocyna [M]	KCl [mM]
Kontrola	podstawowa	+	—	—
1 mM KCl		—	—	1
5 mM KCl				5
10 mM KCl				10
25 mM KCl				25
50 mM KCl				50
100 mM KCl				100
10 ⁻⁷ M FC + 1 mM KCl		—	10 ⁻⁷	1
10 ⁻⁷ M FC + 5 mM KCl				5
10 ⁻⁷ M FC + 10 mM KCl				10
10 ⁻⁷ M FC + 25 mM KCl				25
10 ⁻⁷ M FC + 50 mM KCl				50
10 ⁻⁷ M FC + 100 mM KCl				100
10 ⁻⁶ M FC + 1 mM KCl		—	10 ⁻⁶	1
10 ⁻⁶ M FC + 5 mM KCl				5
10 ⁻⁶ M FC + 10 mM KCl				10
10 ⁻⁶ M FC + 25 mM KCl				25
10 ⁻⁶ M FC + 50 mM KCl				50
10 ⁻⁶ M FC + 100 mM KCl				100
EDTA/Pb/Cd/Zn		EDTA/Pb/Cd/Zn	+	—
EDTA/Pb/Cd/Zn + 1 mM KCl	—		—	1
EDTA/Pb/Cd/Zn + 5 mM KCl				5
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 mM KCl				10
EDTA/Pb/Cd/Zn + 25 mM KCl				25
EDTA/Pb/Cd/Zn + 50 mM KCl				50
EDTA/Pb/Cd/Zn + 100 mM KCl				100
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁷ M FC + 1 mM KCl	—		10 ⁻⁷	1
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁷ M FC + 5 mM KCl				5
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁷ M FC + 10 mM KCl				10
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁷ M FC + 25 mM KCl				25
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁷ M FC + 50 mM KCl				50
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁷ M FC + 100 mM KCl				100
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁶ M FC + 1 mM KCl	—		10 ⁻⁶	1
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁶ M FC + 5 mM KCl				5
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁶ M FC + 10 mM KCl				10
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁶ M FC + 25 mM KCl				25
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁶ M FC + 50 mM KCl				50
EDTA/Pb/Cd/Zn + 10 ⁻⁶ M FC + 100 mM KCl				100

3.1.3. Doświadczenia wazonowe

Celem doświadczeń wazonowych było sprawdzenie, czy traktowanie pędów związkami stymulującymi transpirację (FC, FC + KCl) lub samym KCl, bez i po wprowadzeniu EDTA do gleby, zwiększy akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych roślin. Badano także, czy obniżenie transpiracji zmniejszy zawartość Pb i Cd w pędach. W tym celu opryskiwano części nadziemne roślin kwasem abscysynowym (ABA), który powoduje zamykanie szparek, a w konsekwencji obniża natężenia transpiracji (Zeiger, 1983; Blatt, Thiel, 1993; Dodd, 2003; Roelfsema, Hedrich, 2005). Ponadto stosowano w badaniach glifosat (herbicyd), zakładając, że podany wraz z EDTA zwiększy indukujące hyperakumulację metali działanie związku kompleksującego. Doświadczenia prowadzono z dwoma gatunkami roślin (gorczycą sarepską 'Phyto 426' i słonecznikiem 'Lech').

Do badań użyto gleby zanieczyszczonej Pb i Cd, pochodzącej z okolic huty cynku i ołowiu, natomiast nie stosowano gleby sztucznie wzbogaconej w oba te metale. W pierwszym przypadku metale są w kontakcie z substratem glebowym przez wiele lat, co prowadzi do ich wiązania z różnymi frakcjami w glebie, w wyniku czego biodostępność metali maleje (Almås i współpr., 1999; Lock, Janssen, 2001, 2003). Natomiast w glebach sztucznie zanieczyszczonych, ze względu na krótki okres stażowania (od 2 do 6 tygodni), ilość biodostępnych form metali jest większa (Lock, Janssen, 2003), co może zwiększać efektywność fitoekstrakcji.

3.1.3.1. Przygotowanie gleby oraz uprawa roślin

Do badań użyto gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi, głównie Pb, Cd i Zn, w wyniku działalności Kombinatu Górniczo-Hutniczego „Orzeł Biały”, zlokalizowanego na granicy Bytomia i Piekar Śląskich. Glebę pobraną w terenie (około 1 000 kg) z warstwy 0–25 cm przewożono do IETU i suszono na powietrzu przez kilka dni, wielokrotnie mieszając za pomocą szpadla. Po wysuszeniu glebę przesiewano wstępnie, aby oddzielić kamienie, i po rozdrobieniu większych brył przesiewano ją przez sito o otworach 4 mm. Z różnych miejsc przyzmy gleby pobierano co najmniej 5 prób glebowych, tworzących jedną próbę zbiorczą, która służyła do oznaczenia właściwości gleby.

Doświadczenia prowadzono w plastikowych doniczkach o średnicy 7 cm, wypełnionych 25 g drenażu i 170 g powietrznie suchej gleby, przesianej przez sito 4 mm. Suchą glebę podlewano 60 ml wody wodociągowej i pozostawiano

na 24 godziny. Następnie wysiewano do każdej z nich po 7 nasion gorczycy saperskiej 'Phyto 426' lub 4 nasiona słonecznika 'Lech', które przysypywano 10 g powietrznie suchej gleby, spryskiwanej do zwilżenia wodą wodociągową, i przenoszono doniczki do nieklimatyzowanej hali vegetacyjnej. Nasiona przed wysiewem zaprawiano przeciwgrzybową zaprawą nasienną Funaben T. W 15. dniu od wysiewu przeprowadzano przerywanie, pozostawiając w doniczkach po 1 roślinie. Rośliny, począwszy od 5. dnia od wysiewu, były nawożone 2 razy w tygodniu 15 ml FLOROVITU, w rozcieńczeniu zgodnym z zaleceniem producenta. Raz w tygodniu dodatkowo nawożono je dolistnie preparatem POKON. Codziennie podlewano wodą wodociągową według zapotrzebowania, a jej nadmiar z podstawki zlewano z powrotem do doniczki. Rośliny rosły w hali vegetacyjnej przez 24 dni od wysiewu przy średniej temperaturze powietrza 23,6°C/19,7°C (dzień/noc), średniej wilgotności powietrza 64,5%/69,5% (dzień/noc) i fotoperiodzie 16/8 godzin (dzień/noc), uzyskiwanym ze światła naturalnego oraz lamp sodowych (Philips, SON-TAGRO 400). Lampy sodowe emitowały światło o średnim natężeniu 12 500 lux.

3.1.3.2. Traktowanie roślin fuzikokcyną (FC), kwasem abscysynowym (ABA), KCl i glifosatem (Glif)

W celu zwiększenia transpiracji przez stymulację otwierania szparek pędy roślin były opryskiwane FC tylko w stężeniu 10^{-6} M, ponieważ badania w kulturach hydroponicznych wykazały brak istotnego wpływu stężenia 10^{-7} M na transpirację i akumulację Pb i Cd. W przypadku KCl o wyborze stężenia 25 mM zdecydowały badania w kulturach hydroponicznych oraz badania wstępne autora (M a ł k o w s k i i współpr., 1997). Jako związek chemiczny zamykający szparki i obniżający transpirację (D o d d, 2003) zastosowano ABA w stężeniu 10^{-5} M (P e m a d a s a, 1981).

W fitoekstrakcji indukowanej konieczne jest zastosowanie związku(ów) indukującego w roślinach hyperakumulację metali. Najczęściej dotychczas badanym, jak również najbardziej efektywnym, związkiem indukującym jest EDTA (R a s k i n i współpr., 1997; S a l t i współpr., 1998; S c h m i d t, 2003). Wielu badaczy stosowało sól sodową EDTA zarówno w kulturach hydroponicznych (S a r r e t i współpr., 2001; B o o n y a p o o k a n a i współpr., 2005; S u n i współpr., 2005; de la R o s a i współpr., 2007; H e r n á n d e z - A l l i c a i współpr., 2007), jak i w uprawach na podłożu stałym (K i r k - h a m, 2000; L i p h a d z i i współpr., 2003; T h a y a l a k u m a r a n i współpr., 2003; C u i i współpr., 2004; W u i współpr., 2004; L u o i współpr., 2005; Z h u a n g i współpr., 2005; C h e n i współpr., 2007;

Shibata i współpracownicy, 2007). Natomiast niewielu autorów używało soli potasowej EDTA (Blaylock i współpracownicy, 1997; Vassil i współpracownicy, 1998; Walker i współpracownicy, 2003). W badaniach wazonowych prezentowanych w niniejszej monografii zastosowano sól trójpotasową EDTA (K_3EDTA) w ilości 5 mmoli/kg powietrznie suchej gleby, podawaną bezpośrednio do gleby w postaci roztworu wodnego. Ilość wersenianu wybrano na podstawie badań własnych (Kucharski i współpracownicy, 1997a i b), jak również danych z literatury (Blaylock i współpracownicy, 1997). Zastosowano sól potasową EDTA, aby uniknąć wprowadzenia do gleby sodu, który pogarsza jej fizyczne właściwości, niszcząc strukturę gruzełkową przez dyspergowanie koloidów zlepiających agregaty strukturalne gleby (Gliński, 1999). Prowadzenie fitoekstrakcji indukowanej z użyciem soli sodowej EDTA w określonym miejscu przez kilka kolejnych lat wiązałoby się z wprowadzeniem do gleby znacznych ilości sodu. Natomiast podawanie soli potasowej EDTA jedynie wzbogaca glebę w potas będący makroelementem.

Zbadano także wpływ glifosatu (Glif), czyli N-(fosfonometyl)glicyny, w celu zwiększenia indukcyjnego działania EDTA. Opierano się w tym przypadku na danych wskazujących, że glifosat pobrany przez tkanki liści jest floemem transportowany do korzeni (Devine i współpracownicy, 1983; Reddy, 2000), gdzie wywołuje zmiany w metabolizmie (Fuchs i współpracownicy, 2002), mogące zwiększać wpływ związku chelatującego na pobieranie i transport metali ciężkich do pędów. Glifosat podawano w postaci herbicydu ROUNDAP 360SL (Monsanto). W 1 l tego herbicydu znajduje się 360 g glifosatu w postaci soli izopropylaminowej oraz środek powierzchniowo czynny, zmniejszający napięcie powierzchniowe. Stężenie glifosatu zastosowane w badaniach (32 mM) było o 1/4 niższe od zalecanego przez producenta, co miało spowolnić tempo

Tabela 4

Warianty doświadczenia wazonowego

Wariant doświadczenia	Związki chemiczne dodawane do gleby	Związki chemiczne, którymi opryskiwano pędy
Kontrola	—	woda dejonizowana
FC	—	10^{-6} M FC
K25	—	25 mM KCl
ABA	—	10^{-5} M ABA
K25/FC	—	25 mM KCl + 10^{-6} M FC
EDTA	K_3EDTA	woda dejonizowana
EDTA/FC	K_3EDTA	10^{-6} M FC
EDTA/K25	K_3EDTA	25 mM KCl
EDTA/K25/FC	K_3EDTA	25 mM KCl + 10^{-6} M FC
EDTA/ABA	K_3EDTA	10^{-5} M ABA
EDTA/Glif	K_3EDTA	32 mM glifosat

zamierania roślin. Roztworem glifosatu (32 mM) spryskiwano pędy roślin aż do równomiernego pokrycia nim łodyg i liści, nie kierując się objętością zużytego roztworu.

Po 24 dniach od wysiewu doniczki zawierające po jednej roślinie spryskiwano wymienionymi wcześniej roztworami w ilości 10 ml na roślinę lub glifosatem, aż do równomiernego pokrycia roztworem pędów. W trakcie oprysku doniczki okrywano szczelnie folią aluminiową, aby ograniczyć przedostawanie się do gleby roztworów podawanych na pędy. Nadmiar roztworu pozostający na folii po oprysku usuwano za pomocą ligniny. W wariantach, w których stosowano związek chelatujący, wprowadzano do gleby K_3EDTA w ilości 5 mmoli/kg gleby. Rośliny w wariantach kontrolnym oraz w wariantach tylko z $EDTA$ były opryskiwane wodą dejonizowaną. Wykaz wariantów doświadczenia wazonowego zamieszczono w tabeli 4.

Po 7 dniach pędy roślin były ścinane w odległości 1 cm od powierzchni gleby, płukane 2-krotnie wodą dejonizowaną i suszone w suszarce przez 3 dni, w temperaturze $70^{\circ}C$, do uzyskania suchej masy.

3.1.3.3. Pomiar transpiracji

Transpirację oceniano metodą wagową, na podstawie ubytku wody z doniczek z roślinami, i przedstawiono w ml H_2O/g ś.m. pędów. Po opryskaniu roślin doniczki z gorczycą sarepską 'Phyto 426' i słonecznikiem 'Lech' ważono na wadze i wagę ich uzupełniano wodą wodociągową do ustalonej wcześniej masy, odpowiadającej 90% pojemności połowej.

Ponieważ zastosowano małe doniczki o średnicy 7 cm, zawierające tylko 170 g powietrznie suchej gleby, możliwe było ich ważenie na wadze z dokładnością do 0,01 g. Następnie doniczki pozostawiano w hali wegetacyjnej przykryte szczelnie folią aluminiową. Doniczki ważono codziennie, przez 7 dni, uzupełniając za każdym razem ich masę wodą wodociągową do 90% pojemności połowej. Wagi dokonywano o stałej porze, odpowiadającej godzinie opryskania roślin.

Równocześnie w hali wegetacyjnej umieszczono 7 doniczek tylko z glebą, przygotowanych w identyczny sposób jak doniczki z roślinami. Doniczki te również ważono codziennie i uzupełniano ich masę do 90% pojemności połowej. Chociaż wyliczona dla nich średnia ewaporacja wynosiła mniej niż 4%, odejmowano ten wynik od każdego wyniku dla prób doświadczalnych.

Z pomiaru transpiracji wyłączono doświadczenia, w których rośliny były traktowane glifosatem ($EDTA/Glif$). Wcześniejsze badania z różnymi gatunkami roślin, w tym badania własne na gorczycy sarepskiej i słoneczniku, wykazały

bowiem silne hamowanie przewodnictwa szparkowego oraz transpiracji pod wpływem glifosatu (Shaner, 1978; Shaner, Lyon, 1980; Muñoz-Rueda i współprac., 1986).

W ciągu 7 dni badań średnia wilgotność oraz temperatura dnia i nocy, fotoperiod, jak również natężenie sztucznego światła nie odbiegały od wartości tych parametrów opisanych w warunkach uprawy roślin.

3.2. Badania na poziomie tkankowym

Badania wazonowe wykazały, że wprowadzenie EDTA do gleby jest niezbędne, aby doprowadzić do indukcji hyperakumulacji Pb i Cd w roślinach, a dodatkowe spryskanie pędów roślin glifosatem (Glif) znacznie zwiększa indukcyjne właściwości chelatora. Zbyt mało jest jednak danych dotyczących sposobu oddziaływania obu związków chemicznych na pobieranie przez komórki roślin Pb lub Cd. Szczególnie dotyczy to glifosatu. Wielokrotnie badano wpływ różnych jonów (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) na pobieranie tego związku chemicznego (Burton, Balke, 1988; Mervosh, Balke, 1991; Tilquin i współprac., 2000), natomiast zupełnie brak danych na temat wpływu glifosatu na pobieranie przez komórki roślinne Pb lub Cd.

Celem badań na poziomie tkankowym było określenie, czy EDTA lub glifosat (Glif) stymulują pobieranie Pb przez komórki i jego akumulację w symplasmie, czy też powodują odkładanie metalu w przestworach i ścianach komórkowych (apoplast). Doświadczenia przeprowadzono na segmentach koleoptyli kukurydzy, które są układem modelowym w różnorodnych badaniach fizjologicznych, na przykład: pobierania aminokwasów (Eherton, Rubinstein, 1978), transdukcji sygnału (Zaina i współprac., 1994), plastycznej i elastycznej rozciągliwości ściany komórkowej (Kutschera, 1996), funkcjonowania kanałów potasowych (Thiel, Weise, 1999) czy też wpływu regulatorów roślinnych na potencjał błonowy (Karcz, Burdach, 2007). Koleoptyle charakteryzuje bardzo prosta budowa anatomiczna. Segmenty wycięte z koleoptyli, po usunięciu z wnętrza pierwszego liścia, na przekroju poprzecznym mają kształt cylindryczny. Otoczone są jednowarstwową epidermą zewnętrzną i wewnętrzną, a poza nimi, prawie całą objętość segmentu wypełniają komórki parenchymatyczne. Dwie niewielkie wiązki przewodzące nie mają kambium i wraz z epidermą stanowią tylko 10—20% objętości segmentu, w związku z czym wielkość akumulacji metali zależy przede wszystkim od pobierania ich przez komórki parenchymatyczne. Ta bardzo prosta budowa anatomiczna ułatwia desorpcję metali ze ściany komórkowej, a w konsekwencji rozdział metali na akumulowane w symplasmie lub apoplaste.

W segmentach koleoptyli oznaczano zawartość Pb oraz Ca i K. Zrezygnowano z oznaczania Cd, ponieważ w badaniach hydroponicznych i wazonowych pobieranie oraz akumulacja Pb i Cd w pędach roślin pod wpływem EDTA i glifosatu przebiegały podobnie. Zawartość potasu określano ze względu na jego akumulację przede wszystkim w symplaście, a wapnia, ponieważ akumulowany jest zarówno w apoplaście, jak i w symplaście. Ponadto zmniejszenie zawartości potasu świadczy o uszkodzeniu błon i zwiększeniu ich przepuszczalności, w wyniku czego dochodzi do wypływu tego pierwiastka z komórek (symplastu).

3.2.1. Uprawa siewek kukurydzy i przygotowanie segmentów koleoptyli

Badania prowadzono na kukurydzy *Zea mays* 'Koka'. Nasiona moczoło w wodzie wodociągowej przez 120—180 min i wysiewano do plastikowych kuwet zawierających perlit, wcześniej nasączony wodą wodociągową. Siewki rosły w ciemności, w termostacie, w temperaturze $27 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 4 dni. Następnie wycinano z nich 1-centymetrowe segmenty koleoptyli w odległości 3 ± 1 mm od wierzchołka (K a r c z, B u r d a c h, 2007). Z segmentów usuwano pierwszy liść, a następnie przecinano je żyłką wzdłuż wiązek przewodzących (oś podłużna) na 2 połowy. Przycinanie segmentów było niezbędne do ułatwienia kontaktu roztworu z wewnętrzną powierzchnią segmentów.

3.2.2. Inkubacja segmentów

Preinkubację segmentów prowadzono w roztworze o składzie: 1 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂ i 0,1 mM NaCl, określanym dalej jako APW. Roztwór ten jest standardowo używany w badaniach z segmentami koleoptyli (P e t e r s, F e l l e, 1991; K a r c z, K u r t y k a, 2007). Wyjściowe pH APW do preinkubacji segmentów wynosiło 5,7—6,0 i ustalano je za pomocą 0,1 M NaOH lub 0,1 M HCl.

Sto przeciętych na połowę segmentów wkładano do szklanej zlewki, zawierającej 500 ml roztworu APW (5 ml roztworu/segment). Wcześniejsze doświadczenia autora potwierdziły, że taka proporcja powoduje jedynie minimalne zmiany pH roztworów, w związku z czym nie było konieczne stosowanie buforów. Badania K ł a p c i ń s k i e j (1989) wykazały bowiem, że nawet bufor

HEPES, nieoddziałujący z większością kationów, powodował wytrącanie soli ołowiu. Następnie zlewkę przenoszono do szklanego zbiornika z termostatem i rozpoczynano 2-godziną preinkubację. Po zakończeniu preinkubacji roztwór APW usuwano, zlewkę napełniano roztworem inkubacyjnym (500 ml, pH 5,7—6,0) i przenoszono ponownie do inkubacji w termostatowanym zbiorniku (czas inkubacji 15—240 min). Inkubację prowadzono w następujących roztworach:

APW,

APW + 0,1 mM Pb,

APW + 0,1 mM Pb + 0,75 mM K₂EDTA,

APW + 0,1 mM Pb + 32 mM Glif.

Stężenia K₂EDTA i glifosatu odpowiadały stężeniom tych związków stosowanych w badaniach na poziomie organizmalnym.

Po inkubacji roztwór usuwano, a segmenty płukano 2-krotnie wodą dejonizowaną, osuszano bibułą filtracyjną i suszono w temperaturze 70°C przez 3 dni, aż do uzyskania suchej masy. W tak przygotowanych segmentach oznaczano całkowitą zawartość Pb, Ca i K. Aby określić miejsce akumulacji metali w apoplacie lub symplacie, po inkubacji segmenty z niektórych zlewek poddawano desorpcji, w celu usunięcia metali z przestworów i ścian komórkowych. Zawartość pierwiastków w segmentach poddanych desorpcji traktowano jako ich zawartość w symplacie. Segmenty te także 2-krotnie płukano wodą dejonizowaną, a następnie przenoszono do zlewki zawierającej 500 ml roztworu desorpcyjnego i przeprowadzano desorpcję w termostatowanym zbiorniku przez 30 min. Po desorpcji segmenty ponownie 2-krotnie płukano wodą dejonizowaną i postępowano tak samo, jak z segmentami niedesorbowanymi. Skład roztworu desorpcyjnego opracowano zgodnie z metodą opisaną przez Huang i Cunningham (1996). Autorzy ci stwierdzili, że najbardziej efektywnym roztworem desorpcyjnym dla Pb, w porównaniu z kwasem cytrynowym i CaCl₂, był 1 mM HEDTA o pH 4,5 (Huang, Cunningham, 1996). W niniejszej pracy zamiast HEDTA zastosowano Na₂EDTA, ponieważ wielu autorów wykazało, że wersenian cechuje silniejsze powinowactwo do Pb w porównaniu z innymi związkami chelatującymi, w tym HEDTA (Huang i współpr., 1997; Meers i współpr., 2004; Luo i współpr., 2005). Desorpcję tkanek roślinnych przeprowadza się najczęściej w temperaturze 4°C (Rouser, 1987), jednak wstępne badania potwierdziły brak istotnych statystycznie różnic w desorpcji Pb z segmentów koleoptyli w temperaturze 4°C i 25°C. Również Stracek i współpr. (2008) nie obserwowali istotnej różnicy w wielkości desorpcji Zn z korzeni tytoniu, przy użyciu 10 mM EDTA, w temperaturze 4°C i 25°C. W związku z tym desorpcję Pb, Ca i K z segmentów koleoptyli kukurydzy przeprowadzano w 1 mM Na₂EDTA o pH 4,5 ± 0,1, w temperaturze 25 ± 1°C.

Zarówno czynności związane z przygotowaniem segmentów, jak również preinkubację, inkubację i desorpcję prowadzono przy słabym zielonym świetle, by uniknąć wpływu światła białego. Wszystkie roztwory w trakcie eksperymentów były napowietrzane w celu ich mieszania, jak również utrzymania ilości tlenu umożliwiającego oddychanie tlenowe segmentów. Temperaturę roztworów utrzymywano za pomocą termostatu w zakresie $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3. Metody analityczne

Większość analiz, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy, wykonano w Centralnym Laboratorium IETU, uczestniczącym w międzynarodowych badaniach międzylaboratoryjnych, w programach *International Soil Analytical Exchange* (ISE) i *International Plant-Analytical Exchange*, prowadzonych przez Wageningen Agricultural University w Holandii. Część analiz (mineralizacja segmentów koleoptyli, oznaczanie zawartości pierwiastków metodą ICP-AES) przeprowadzono w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Wszystkie analizy gleby, oprócz składu granulometrycznego (1 mm), prowadzono na powietrze suchej glebie, utartej do ziarna 0,25 mm. Odczyn gleby oznaczano w 1 M KCl. W tym celu 10 g gleby zalewano 25 ml 1 M KCl i po zamieszaniu pozostawiano na 24 godziny. Pomiar pH wykonywano za pomocą pehametru-konduktometru (CPC 551, CKSAiP „Mera-Elwro”, Wrocław) i zespolonej elektrody pH typu ERH 111 (WCW „Metron”, Czekanów). Przewodnictwo elektryczne gleby (EC) oznaczano w ekstrakcie wodnym (10 g/25 ml gleba/woda dejonizowana). Całkowitą zawartość N określono metodą Kjeldahla, a zawartość P i K — metodą Egnera-Riehma (Ostrowska i współpr., 1991). Całkowitą zawartość metali (Pb, Cd, Zn) oznaczano, mineralizując 1 g powietrze suchej gleby w 10 ml wody królewskiej, w układzie zamkniętym, w mikrofalowym systemie MDS 2000 (CEM, USA).

W celu określenia zawartości pierwiastków (Pb, Cd, K, Ca, Zn) w wysuszonym materiale roślinnym mineralizowano go na mokro w 5 ml stężonego HNO_3 , w układzie zamkniętym w mikrofalowym systemie MDS 2000 (CEM, USA).

W zmineralizowanym materiale roślinnym lub glebowym zawartość pierwiastków oznaczano, używając spektrofotometru absorpcji atomowej (Varian Spectra AA300, USA) lub techniką spektrometrii emisyjnej, ze wzbudzeniem w argonowej plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-AES, Spectro Analytical Instruments, Niemcy).

Wszystkie przedstawione w pracy wyniki są średnimi z co najmniej 3 powtórzeń \pm błąd standardowy (BS). W celu określenia istotnych statystycznie różnic między średnimi stosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test „najmniejszej istotnej różnicy” (NIR). Aby sprawdzić zależności między transpiracją i akumulacją metali w pędach, obliczono współczynniki korelacji Pearsona. Wszystkie statystyczne obliczenia przeprowadzono, korzystając z programu Statistica 5.0 PL lub 7.1 PL.

4. Wyniki

4.1. Wpływ FC i KCl na transpirację oraz zawartość Pb, Cd, K, Ca i Zn w pędach gorzycy sarepskiej — badania w kulturach hydroponicznych

W celu określenia zależności między akumulacją Pb i Cd a transpiracją w fitoekstrakcji indukowanej przeprowadzono badania w kulturach hydroponicznych z gorzycą sarepską. Związkiem stymulującym natężenie transpiracji była fuzikokcyna (FC) w połączeniu z KCl. Fuzikokcynę wybrano ze względu na bardzo silną, w porównaniu z wcześniej badanymi fitohormonami, stymulację transpiracji przez otwieranie szparek nawet w ciemności (Z e i g e r, 1983; A s s m a n, S c h w a r t z, 1992). Zastosowano sól potasową, ponieważ działanie FC na otwieranie szparek skorelowane jest z pobieraniem dużych ilości jonów K^+ przez komórki roślin (S o n d e r g a a r d i w s p ó ł p r., 2004). Można więc było przypuszczać, że jednoczesne traktowanie roślin FC i KCl może mieć dodatni wpływ zarówno na natężenie transpiracji, jak i akumulację metali w roślinach. Badano także działanie samego KCl na transpirację i zawartość Pb i Cd w pędach, aby móc rozdzielić efekt wywołany podaniem regulatora roślinnego od działania soli potasowej. O przeprowadzeniu eksperymentów z samym KCl zdecydowały także wyniki badań wstępnych autora niniejszej monografii wykazujące, że po wprowadzeniu EDTA do gleby oprysk 25 mM KCl zwiększył w istotny sposób zawartość Pb i Cd w pędach gorzycy w stosunku do wariantu bez KCl (M a ł k o w s k i i w s p ó ł p r., 1997).

Doświadczenia prowadzono zarówno w pożywce podstawowej, zawierającej makro- i mikroelementy, jak i w pożywce podstawowej zawierającej dodatkowo EDTA, Pb, Cd i o podwyższonym stężeniu Zn (pożywka EDTA/Pb/Cd/Zn). Do pożywki EDTA/Pb/Cd/Zn wprowadzono dodatkową ilość cynku, ponieważ gleby z okolic hut oraz kopalń cynku i ołowiu charakteryzuje wysoka zawartość nie tylko Pb i Cd, ale także Zn (K u c h a r s k i i w s p ó ł p r., 2005; A l e k s a n d e r - K w a t e r c z a k, H e l i o s - R y b i c k a, 2009). EDTA został dodany do pożywki w celu indukcji hyperakumulacji Pb i Cd w roślinach; zawar-

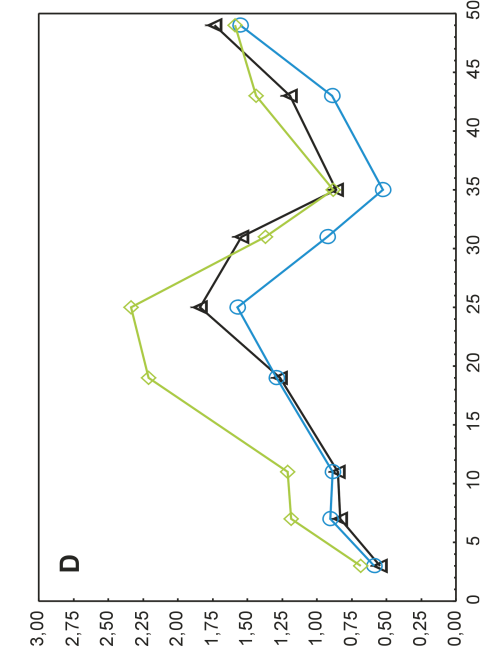
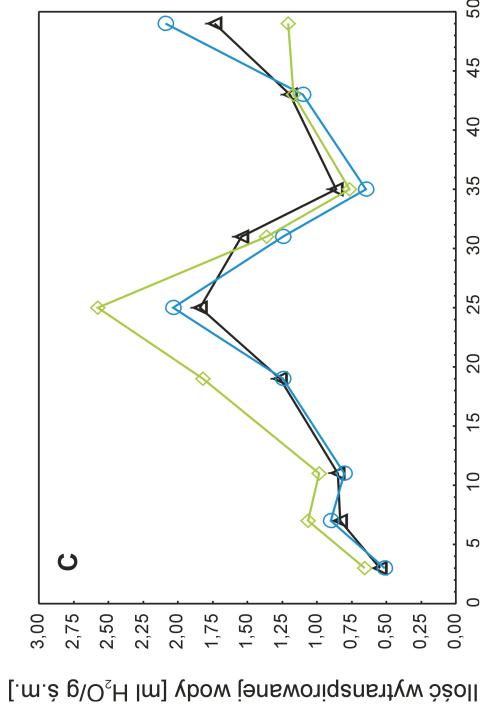
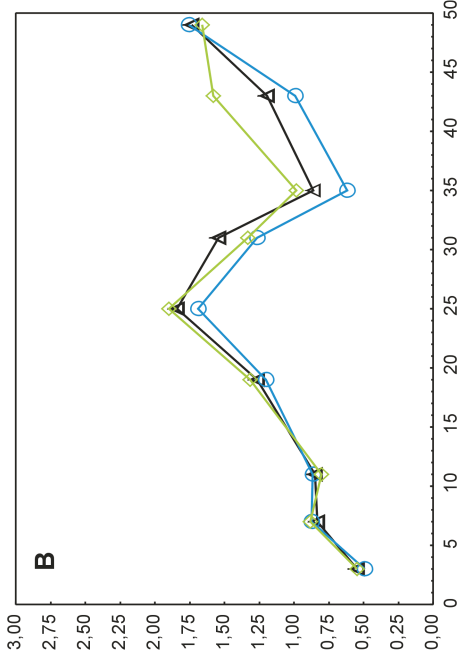
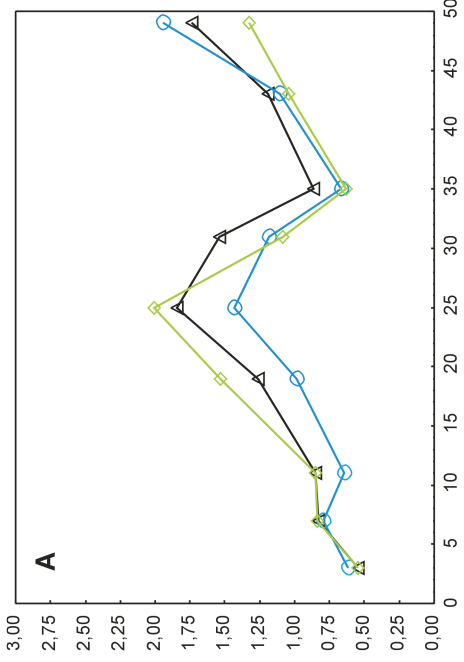
tość tych metali oznaczono w pędach. W pędach oznaczano również zawartość K, Ca i Zn, ze względu na ich odmienny sposób przemieszczania się w poprzek korzenia do walca osiowego. Wapń przemieszcza się do walca osiowego zarówno drogą apoplastyczną, jak i symplastyczną (White, 2001), a K jest transportowany przede wszystkim symplastem. Zakładano więc, że transpiracja może mieć duży wpływ na pobieranie i akumulację Ca, a minimalny wpływ na pobieranie i akumulację K (Marschner, 1995). Zawartość Ca, a ponadto Zn, oznaczano również ze względu na fakt, że błonowe systemy transportowe jonów tych metali mogą być też drogą pobierania Cd (Verkleij i współprac., 2009), a w niektórych przypadkach także Pb (Sunkar i współprac., 2000; Antosiewicz, 2005).

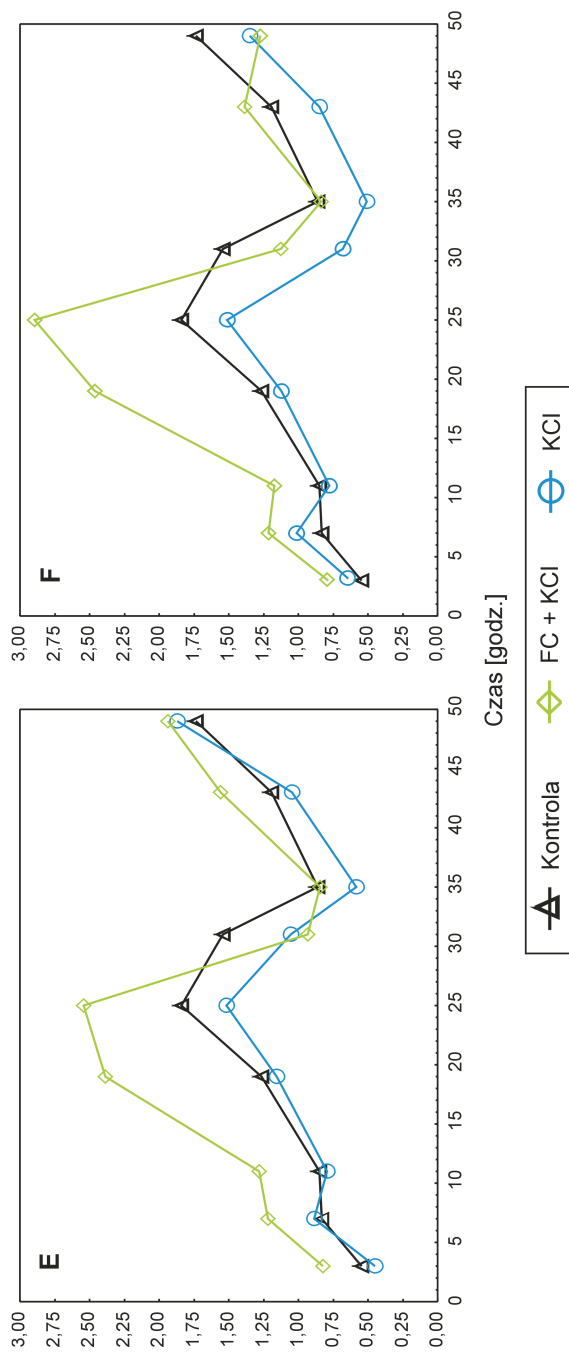
4.1.1. Transpiracja gorczyicy sarepskiej uprawianej w pożywce podstawowej lub w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn

4.1.1.1. Dynamika zmian transpiracji

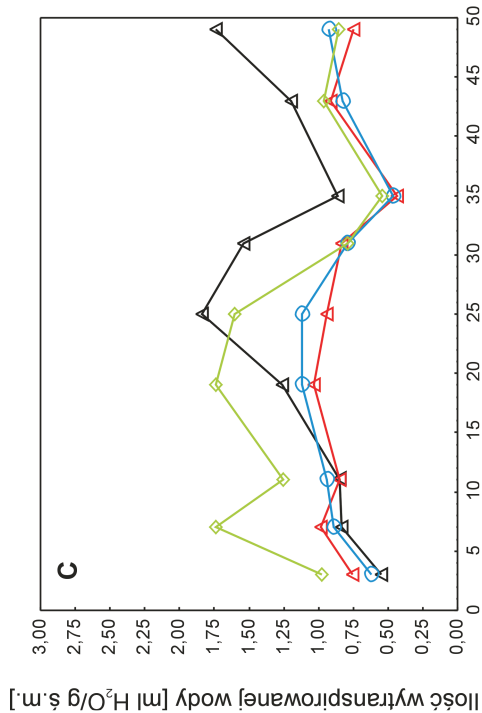
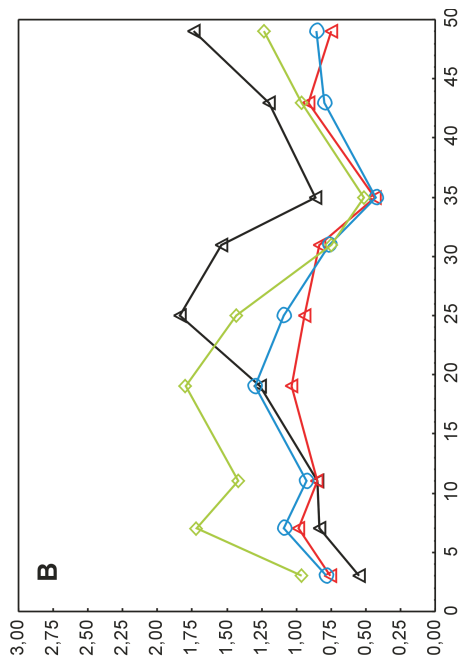
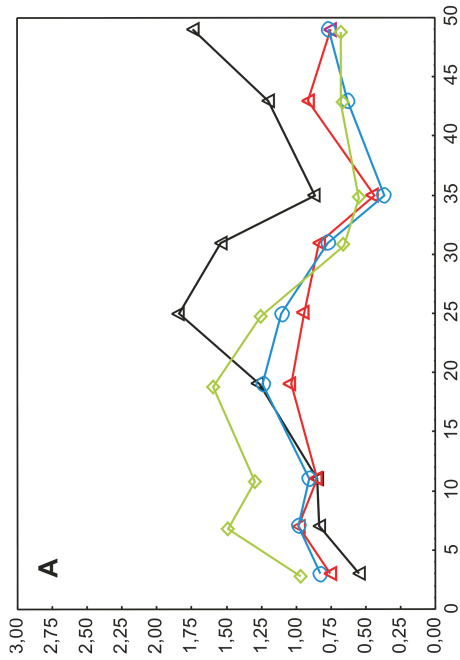
Pomiary ilości wytranspirowanej wody przez pojedyncze rośliny prowadzono po 3, 7, 11, 19, 25, 31, 35, 43 i 49 godzinach od opryskania pędów FC i/lub KCl. W pożywce podstawowej codzienne zmiany w transpiracji, począwszy od 2. doby (między 19 a 35 godziną od opryskania pędów), miały typowy dzienny przebieg niezależnie od wariantu doświadczenia (rys. 3). W 2. dobie transpiracja była niska o godzinie 6¹⁵ (19 godzin), osiągnęła maksimum o godzinie 12¹⁵ (25 godzin), następnie malała, aby o godzinie 22¹⁵ (35 godzin) osiągnąć minimum, po czym ponownie wzrastała wraz z nastaniem nowego dnia i wzrostem intensywności oświetlenia (43 i 49 godzin) (rys. 3).

Opryskiwanie pędów roślin różnymi stężeniami KCl nie miało istotnego statystycznie wpływu na transpirację w porównaniu z kontrolą (rys. 3A—F). Traktowanie pędów gorczyicy 10⁻⁶ M FC w połączeniu z 1 mM KCl nie miało wpływu ani na dynamikę, ani na ilość wytranspirowanej wody, co sugeruje, że użycie tylko FC nie zwiększa transpiracji (rys. 5A). Opryskanie pędów roślin 10⁻⁶ M FC wraz z 25 mM KCl powodowało wzrost transpiracji w ciągu pierwszych 25 godzin eksperymentu, przy czym wzrost ten (w porównaniu z kontrolą) był istotnie wyższy w 11. (22¹⁵) i 19. (6¹⁵) godzinie eksperymentu (rys. 3D). Najsilniejszą stymulację transpiracji obserwowano w przypadku roślin traktowanych 10⁻⁶ M FC i 50 mM KCl (rys. 3 E). Stwierdzono wtedy istotnie wyższą ilość wytranspirowanej wody począwszy od 3. godziny (14¹⁵) aż do 25.

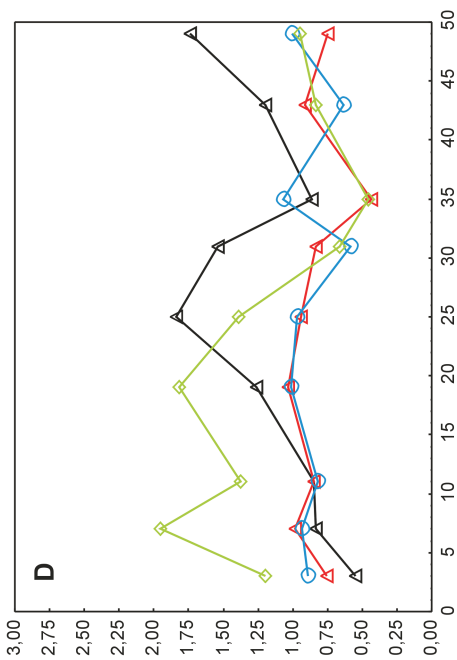


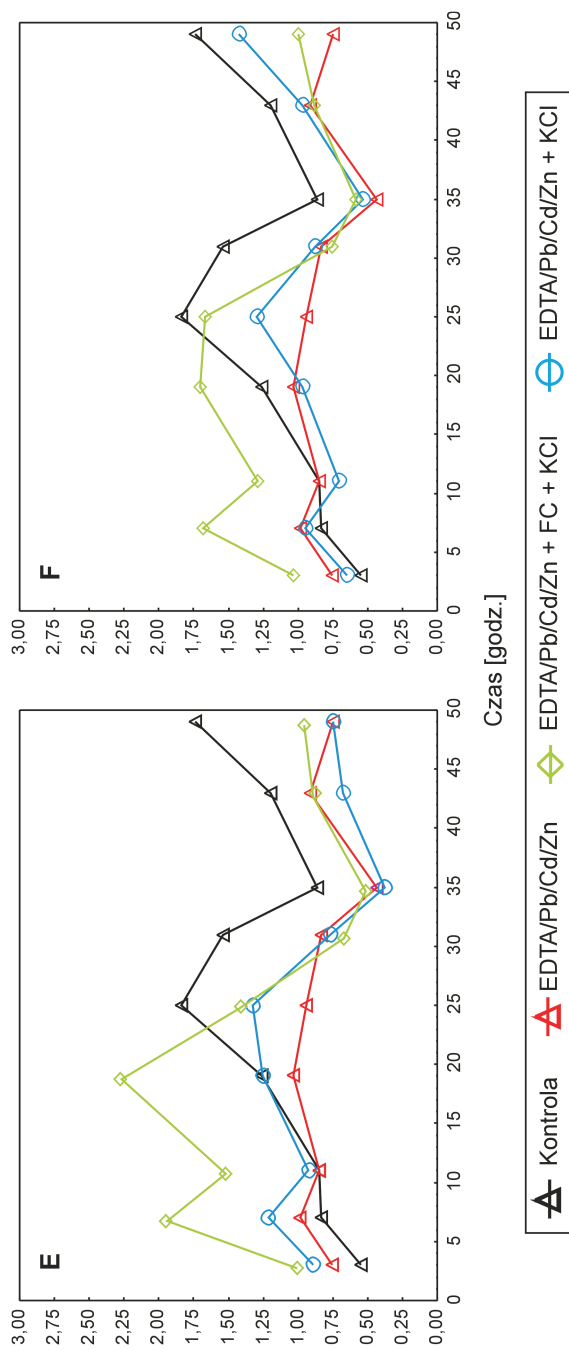


Rys. 3. Wpływ 10^{-6} M fuzikokeyny (FC) i KCl na transpirację gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce podstawowej Kontrola — pędy traktowane wodą dejonizowaną. Warianty FC + KCl lub KCl — pędy traktowane: **A** — 1 mM KCl; **B** — 5 mM KCl; **C** — 10 mM KCl; **D** — 25 mM KCl; **E** — 50 mM KCl; **F** — 100 mM KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych. Zastosowano test NIR, który wykazał różnice (por. tekst) między niektórymi średnimi ($p \leq 0,05$)



Ilość wytranspirowanej wody [ml H₂O/g s. m.]





Rys. 4. Wpływ 10^{-6} M fuzykokoyny (FC) i KCl na transpirację gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn. Kontrola i wariant EDTA/Pb/Cd/Zn — pędy traktowane wodą dejonizowaną. Warianty EDTA/Pb/Cd/Zn + FC + KCl lub EDTA/Pb/Cd/Zn + KCl — pędy traktowane: **A** — 1 mM KCl; **B** — 5 mM KCl; **C** — 10 mM KCl; **D** — 25 mM KCl; **E** — 50 mM KCl; **F** — 100 mM KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych. Zastosowano test NIR, który wykazał różnice (por. tekst) między niektórymi średnimi ($p \leq 0,05$)

godziny (12^{15}) od momentu opryskania roślin. Następnie ten stymulujący efekt zanikał i w 31. godzinie (18^{15}) natężenie transpiracji w tych roślinach było istotnie niższe od transpiracji roślin kontrolnych, a począwszy od 35. godziny nie stwierdzano istotnych statystycznie różnic między roślinami z obu wariantów (rys. 3E). Traktowanie gorczycy 10^{-6} M FC i 100 mM KCl dało istotnie większe od kontroli ilości wytranspirowanej wody po 11., 19. i 25. godzinach eksperymentu (rys. 3F). Natomiast nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznych zmian w transpiracji w przypadku roślin traktowanych niższym stężeniem FC (10^{-7} M), niezależnie od zastosowanego stężenia KCl (dane nieprezentowane na rys. 3).

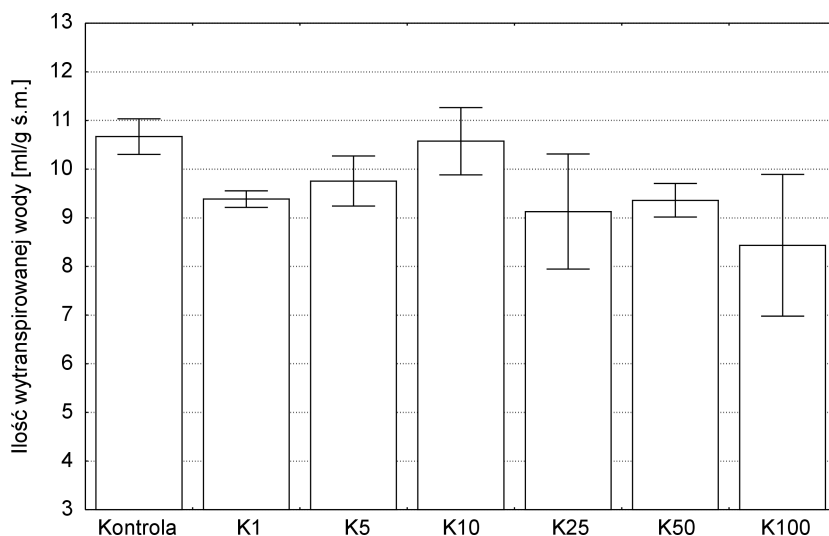
Aby określić, jak oddziaływanie FC i/lub KCl na pędy gorczycy wpłynie na transpirację w trakcie fitoekstrakcji indukowanej, przeprowadzono eksperymenty w pożywce podstawowej, do której dodatkowo wprowadzono EDTA, Pb, Cd i zwiększono stężenie Zn (pożywka EDTA/Pb/Cd/Zn). W opisanych warunkach uprawy w przypadku roślin z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn obserwowano zmniejszenie intensywności transpiracji (w stosunku do kontroli), począwszy od 19. godziny eksperymentu, przy czym obniżenie to było istotne statystycznie w 25. i 31. godzinie od momentu traktowania roślin (rys. 4). Także dobowe przebiegi transpiracji uległy silnym zmianom w przypadku roślin z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn. Przede wszystkim nie obserwowano charakterystycznego maksimum ilości wytranspirowanej wody w środku dnia (godz. 12^{15}), czyli w 25. i 49. godzinie eksperymentu (rys. 4A—F). Opryskanie pędów roślin roztworami KCl nie powodowało żadnych zmian w transpiracji, niezależnie od zastosowanego stężenia soli potasowej.

Stymulacja transpiracji przez 10^{-6} M FC wzrastała wraz ze wzrostem stężenia KCl i w wariantach EDTA/Pb/Cd/Zn + 10^{-6} M FC + 25 mM KCl oraz EDTA/Pb/Cd/Zn + 10^{-6} M FC + 100 mM KCl ilość wytranspirowanej wody była istotnie wyższa od wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn, począwszy od 3. aż do 25. godziny od momentu opryskania pędów roślin (rys. 4D i F). W przypadku roślin opryskanych 10^{-6} M FC + 50 mM KCl stwierdzono najintensywniejszą transpirację w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn (2,25 ml H_2O/g ś.m.) (rys. 4E). Jednak wzrost transpiracji nastąpił dopiero po 7., a nie po 3. godzinach od opryskania pędów, jak to zaobserwowano w przypadku roślin traktowanych 10^{-6} M FC + 25 mM KCl i 10^{-6} M FC + 100 mM KCl. Charakterystyczną cechą wpływu 10^{-6} M FC na transpirację roślin w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn jest jej stymulujące działanie w ciągu godzin wieczornych (7 godzin = 18^{15}) i nocnych (11 godzin = 22^{15}) oraz w godzinach rannych (19 godzin = 6^{15}) 2. dnia od momentu traktowania. Od 31. godziny nie obserwowano już zwiększania transpiracji przez 10^{-6} M FC, niezależnie od stężenia KCl podawanego wraz z regulatorem roślinnym (rys. 4A—F). Fuzikokcyna w stężeniu 10^{-7} M, podobnie jak w pożywce podstawowej, nie miała żadnego wpływu na transpirację, niezależnie od zastosowanego wraz z nią stężenia KCl (dane nieprezentowane na rys. 4).

Zamieszczone wyniki pozwalają stwierdzić, że oprysk pędów 10^{-6} M FC w połączeniu z KCl w stężeniach 25—100 mM istotnie zwiększa transpirację gorczycy rosnącej w pożywce podstawowej. Ta stymulacja transpiracji pod wpływem FC i KCl jest także widoczna w przypadku roślin uprawianych w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn. Otrzymane rezultaty wskazują, że fuzikokcyna oraz jony K^+ zwiększają ilość wytranspirowanej wody, nawet gdy rośliny rosną w pożywce z dodatkiem Pb, Cd i EDTA, a więc czynników ograniczających transpirację.

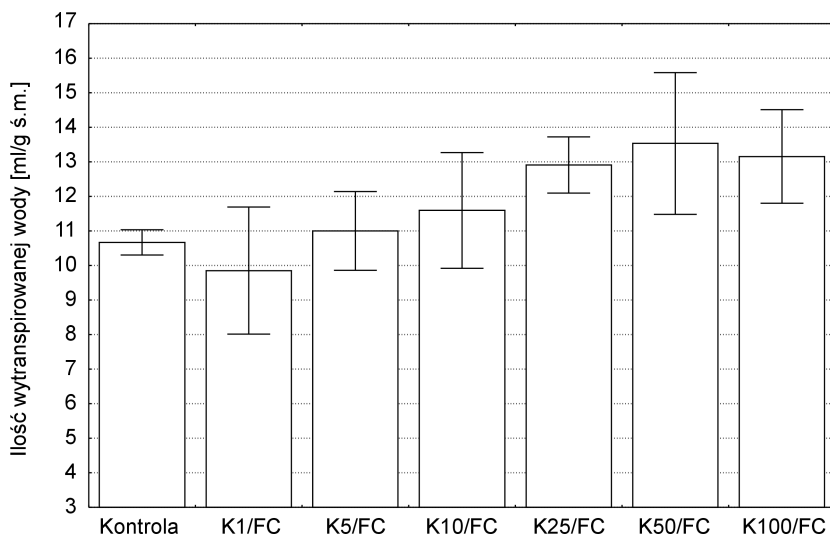
4.1.1.2. Całkowita ilość wytranspirowanej wody w czasie trwania eksperymentu (w ciągu 49 godzin)

Na poziom akumulacji Pb i Cd w pędach może wpływać nie przejściowy wzrost lub spadek, ale całkowita ilość wytranspirowanej wody. Dlatego obliczono także całkowitą ilość wytranspirowanej przez rośliny wody w ciągu 49 godzin eksperymentu. Traktowanie pędów gorczycy roztworami KCl, w stężeniu 1—100 mM, nie wpływało w istotny statystycznie sposób na całkowitą ilość wytranspirowanej wody w porównaniu z kontrolą, chociaż zauważalna jest ten-



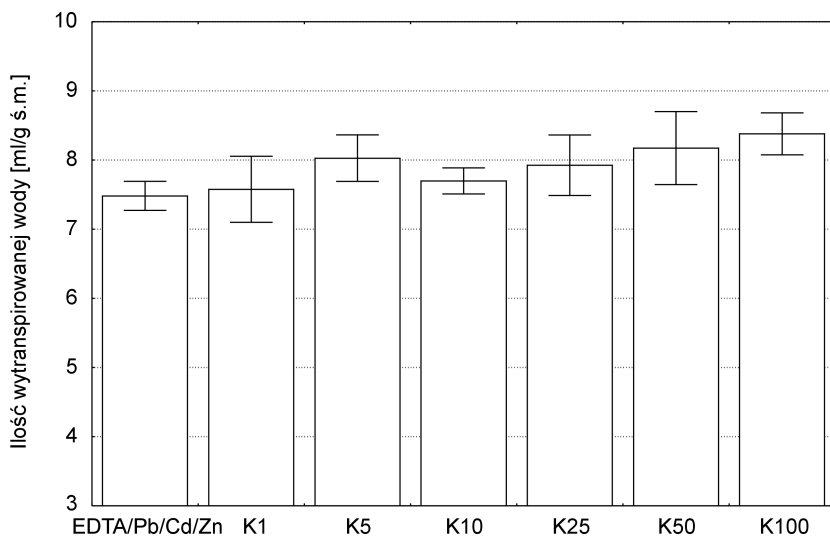
Rys. 5. Wpływ KCl na całkowitą ilość wody wytranspirowanej przez gorczycę sarepską uprawianą w pożywce podstawowej przez 49 godzin

K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Kontrola — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych. Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$)



Rys. 6. Wpływ KCl i 10^{-6} M fuzikocyny (FC) na całkowitą ilość wody wytranspirowanej przez goryczycę sarepską, uprawianą w pożywce podstawowej przez 49 godzin

K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Kontrola — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane FC + KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych. Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$)



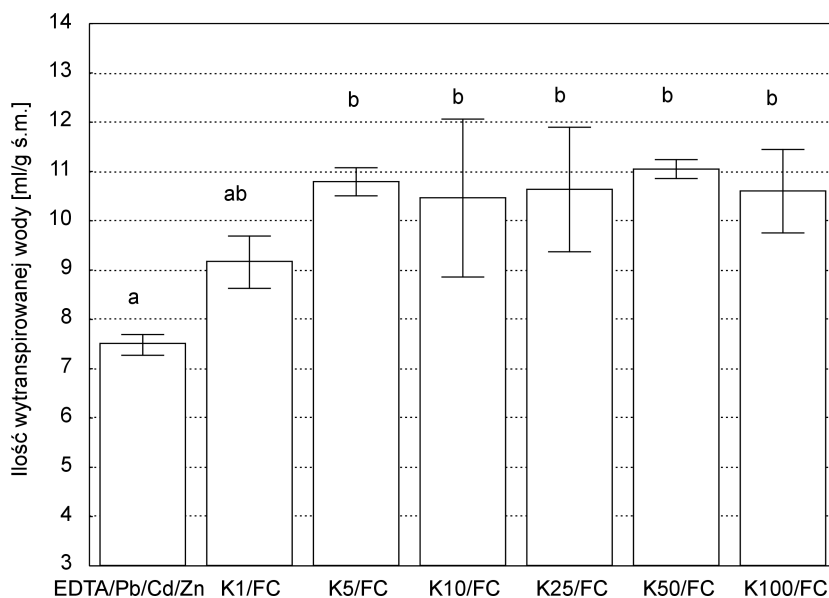
Rys. 7. Wpływ KCl na całkowitą ilość wody wytranspirowanej przez goryczycę sarepską, uprawianą w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Wariant EDTA/Pb/Cd/Zn — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych. Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$)

dencja do zmniejszania się ilości wytranspirowanej wody wraz ze wzrostem stężenia KCl (rys. 5). Odwrotną tendencję, choć także nieistotną statystycznie, stwierdzono po spryskaniu pędów gorczycy roztworami zawierającymi KCl łącznie z 10^{-6} M FC (rys. 6).

Gorczyca uprawiana w pożywce z EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin wytranspirowała znacznie mniejszą ilość wody (7,483 ml/g ś.m.) w porównaniu z roślinami kontrolnymi (10,669 ml/g ś.m.) rosnącymi w pożywce podstawowej. Opryskanie pędów tak uprawianej gorczycy roztworami o różnym stężeniu KCl nie miało istotnego statystycznie wpływu na transpirację w porównaniu z roślinami z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn (rys. 7).

Dodatek 10^{-6} M fuzikokcyny do 1 mM KCl zwiększył ilość wytranspirowanej przez gorczycę wody o 22% w stosunku do wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn (rys. 8). Wzrost stężeń KCl w opryskach, w połączeniu z 10^{-6} M FC, powodował jeszcze większy wzrost ilości wytranspirowanej wody (o 40% dla FC + K10 i 48% w przypadku FC + K50) (rys. 8). Należy podkreślić, że transpiracja u tych roślin była praktycznie taka sama jak w roślinach kontrolnych rosnących w pożywce podstawowej bez Pb, Cd i EDTA. Potraktowanie roślin 10^{-7} M FC wraz z KCl, w stężeniach 1—100 mM, nie wpłynęło istotnie na transpirację gorczycy uprawianej zarówno w pożywce podstawowej, jak i w pożywce



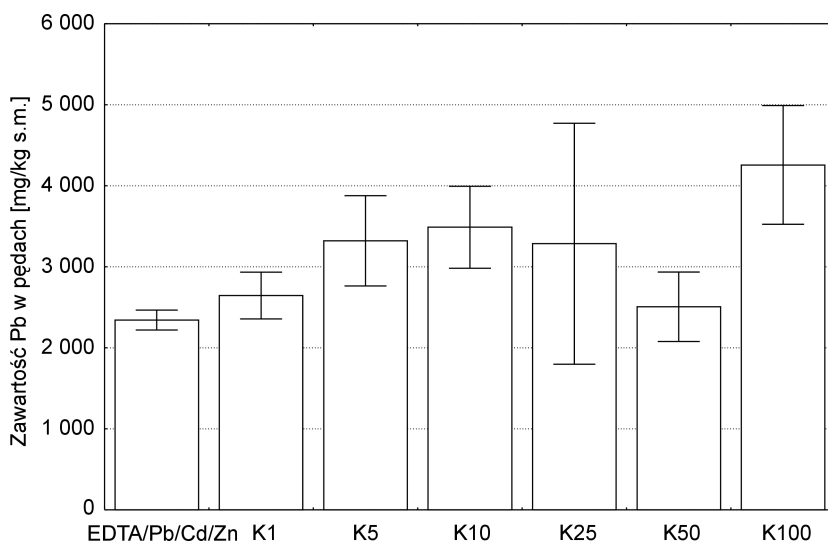
Rys. 8. Wpływ KCl i 10^{-6} M fuzikokcyny (FC) na całkowitą ilość wody wytranspirowanej przez gorczycę sarepską, uprawianą w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Wariant EDTA/Pb/Cd/Zn — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane FC + KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych \pm BS. Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)

EDTA/Pb/Cd/Zn (dane nieprezentowane na wykresach). Zaprezentowane wyniki wskazują, że opryskanie pędów gorczyicy wyłącznie solą potasową nie zwiększa całkowitej ilości wytranspirowanej wody. Natomiast traktowanie roślin 10^{-6} M FC w połączeniu z KCl stymuluje transpirację, szczególnie w przypadku roślin uprawianych w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn.

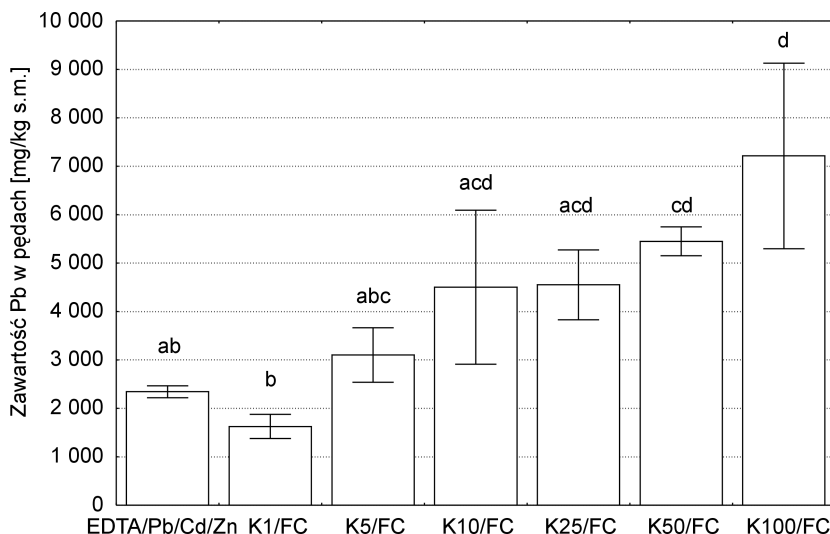
4.1.2. Akumulacja Pb i Cd w pędach gorczyicy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn

Po 49 godzinach wzrostu w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn w pędach gorczyicy oznaczono zawartość Pb i Cd. W roślinach traktowanych KCl można było zaobserwować tendencję do wzrostu zawartości Pb wraz ze wzrostem stężenia KCl (wzrost o 49% przy 10 mM KCl i o 82% przy 100 mM KCl) (rys. 9). Jednak różnice między średnimi, chociaż tak znaczne, nie były istotne statystycznie. Opryskanie pędów roztworami KCl z dodatkiem 10^{-6} M FC skutkowało wyraźnym wzrostem zawartości Pb w częściach nadziemnych roślin, chociaż do 25 mM KCl różnice między średnimi nie były istotne statystycznie (rys. 10).



Rys. 9. Wpływ KCl na akumulację Pb w pędach gorczyicy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Wariant EDTA/Pb/Cd/Zn — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3-4$ dla wariantów eksperymentalnych \pm BS. Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$)



Rys. 10. Wpływ KCl i 10^{-6} M fuzikokcyny (FC) na akumulację Pb w pędach gorczyicy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

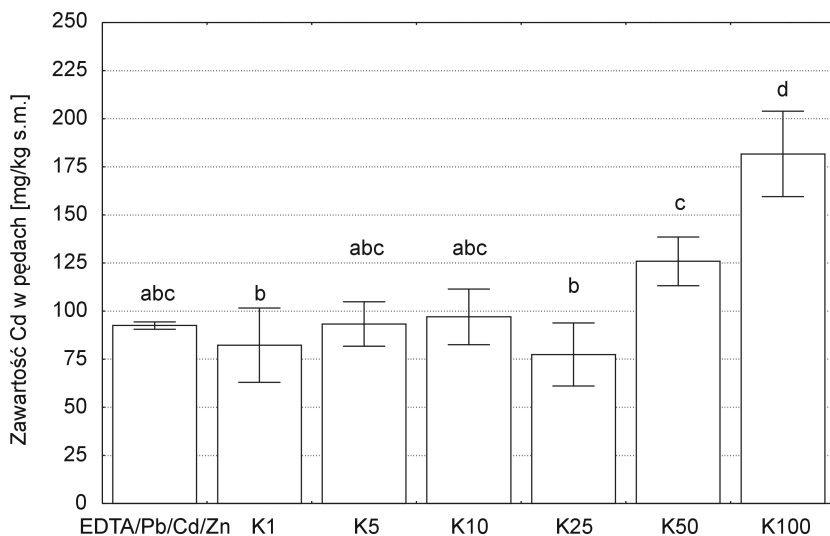
K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Wariant EDTA/Pb/Cd/Zn — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane FC + KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych \pm BS. Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)

Traktowanie roślin 50 mM KCl i 100 mM KCl, w połączeniu z 10^{-6} M FC, powodowało znaczący wzrost akumulacji Pb, która wynosiła odpowiednio 233% i 308% akumulacji w roślinach rosnących w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn, ale nietraktowanych KCl i FC (rys. 10).

Fuzikokcyna i KCl podane w postaci oprysku również zwiększały akumulację Cd w częściach nadziemnych. Traktowanie pędów gorczyicy 50 mM KCl i 100 mM KCl powodowało wyraźny wzrost zawartości Cd w tych organach roślin (rys. 11). Opryskanie części nadziemnych roślin 10^{-6} M FC w kombinacji z różnymi stężeniami KCl wpłynęło na zwiększoną akumulację Cd, a istotne statystycznie różnice w stosunku do wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn obserwowano począwszy od 25 mM KCl (rys. 12). Zbadano także akumulację Pb i Cd w korzeniach roślin z dwóch wybranych wariantów (dane niezamieszczone). Stwierdzono, że zawartość obu metali w korzeniach roślin rosnących w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn i opryskanych 10^{-6} M FC w połączeniu z 25 mM KCl (wariant 1) lub 50 mM KCl (wariant 2) jest niższa od ich zawartości w pędach, co może świadczyć o indukcji hyperakumulacji w gorczyicy sarepskiej 'Phyto 426'.

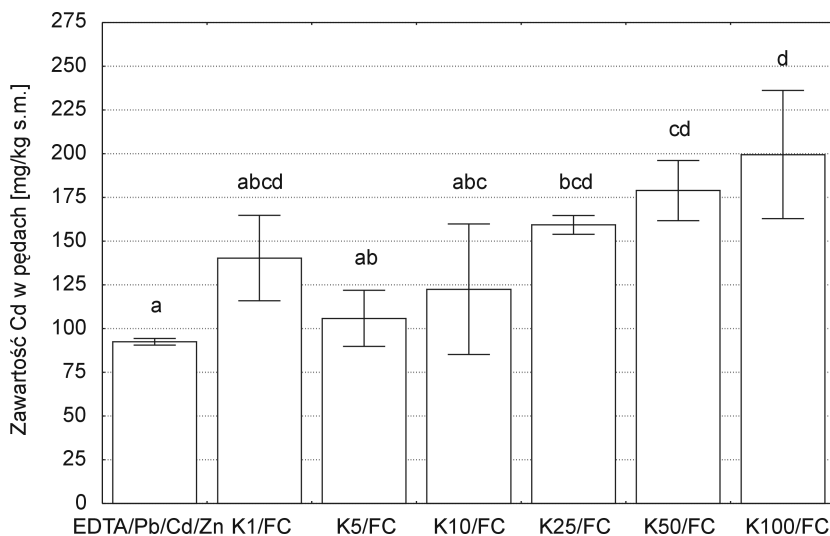
Ze względu na znacznie słabszy wpływ na wielkość transpiracji fuzikokcyny w stężeniu 10^{-7} M, w porównaniu z 10^{-6} M, zrezygnowano z dalszych analiz materiału roślinnego traktowanego niższym stężeniem tego związku.

Omówione badania dowodzą, że opryskanie części nadziemnych 10^{-6} M FC, w połączeniu z KCl w stężeniach od 25 mM do 100 mM, znacznie zwiększa



Rys. 11. Wpływ KCl na akumulację Cd w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Wariant EDTA/Pb/Cd/Zn — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych \pm BS. Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)



Rys. 12. Wpływ KCl i 10^{-6} M fuzikocyny (FC) na akumulację Cd w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

K1, K5, K10, K25, K50 lub K100 — 1, 5, 10, 25, 50 lub 100 mM KCl. Wariant EDTA/Pb/Cd/Zn — pędy opryskane wodą dejonizowaną, pozostałe warianty — pędy opryskane FC + KCl. Przedstawione wyniki są średnimi z $n = 5$ dla kontroli i $n = 3$ lub 4 dla wariantów eksperymentalnych \pm BS. Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)

zawartość Pb i Cd w pędach gorczycy sarepskiej. Biorąc pod uwagę wpływ oprysku FC + KCl na transpirację (rys. 4 i 8), rezultaty te sugerują dodatnią korelację między wielkością transpiracji a akumulacją obu metali w pędach.

4.1.3. Akumulacja K, Ca i Zn w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce podstawowej lub w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn

Zawartość potasu w pędach gorczycy rosnącej w pożywce podstawowej (kontrola) wynosiła 47 338 mg/kg s.m. Opryskiwanie części nadziemnych roślin roztworami KCl o różnych stężeniach nie wpłynęło w istotny statystycznie sposób na akumulację tego pierwiastka w pędach (tabela 5). Począwszy od 10 mM KCl, można zauważyć tendencję spadkową w akumulacji K w pędach wraz ze wzrostem stężenia chlorku potasu. Najniższą zawartość potasu zaobserwowano w roślinach traktowanych 50 mM KCl. Wynosiła ona 37 248 mg/kg i była o 21% niższa od zawartości KCl w kontroli (tabela 5). Zawartość wapnia w pędach gorczycy uprawianej w pożywce podstawowej i opryskiwanej roztworami KCl zmieniała się w niewielkim stopniu. Statystycznie istotne różnice w akumulacji Ca obserwowano po zastosowaniu 10, 25 i 50 mM KCl, gdzie zawartość wapnia spadała w granicach 9—16% (tabela 5). Natomiast zawartość Zn wykazywała tendencję wzrostową wraz ze zwiększaniem stężenia KCl, ale różnice nie były istotne statystycznie (tabela 5).

Tabela 5

Wpływ KCl na akumulację K, Ca i Zn [mg/kg s.m.] w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce podstawowej przez 49 godzin

Stężenie KCl [mM]	Zawartość metalu [mg/kg s.m.]		
	K	Ca	Zn
0 (kontrola)	47 338,0 ± 1 713,0	20 769,9 ± 371,6ae	79,38 ± 2,61
1	45 013,0 ± 2 953,7	19 956,5 ± 587,7ac	84,74 ± 9,67
5	48 610,0 ± 2 438,7	19 405,1 ± 315,2ad	85,82 ± 3,99
10	38 105,0 ± 2 805,7	17 476,7 ± 759,7b	82,59 ± 3,48
25	42 020,0 ± 8 248,7	18 222,8 ± 992,4bd	74,87 ± 0,92
50	37 248,0 ± 2 795,4	18 982,3 ± 285,4bcd	89,29 ± 6,71
100	39 453,0 ± 3 237,7	21 909,9 ± 175,7e	90,32 ± 0,76

Pędy roślin rosnących w pożywce podstawowej opryskiwano roztworem KCl. Rośliny kontrolne były spryskiwane wodą dejonizowaną.

Dane są średnimi ±BS ($n = 5$ dla kontroli; $n = 3-4$ dla wariantów eksperymentalnych). Średnie w kolumnach, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$). Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$).

Fuzikokcyna w połączeniu z KCl w istotny statystycznie sposób obniżała zawartość potasu w pędach gorczycy, natomiast nie powodowała wyraźnych zmian zawartości wapnia w opryskiwanych częściach nadziemnych. Zawartość Zn rosła, osiągając średnio wzrost o 20% w porównaniu z zawartością tego metalu w pędach roślin kontrolnych, a zmiany te były istotne statystycznie (tabela 6).

Tabela 6

Wpływ KCl oraz fuzikokcyny na akumulację K, Ca i Zn [mg/kg s.m.] w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce podstawowej przez 49 godzin

Stężenie KCl [mM]	Fuzikokcyna [10^{-6} M]	Zawartość metalu [mg/kg s.m.]		
		K	Ca	Zn
0 (kontrola)	—	47 338,0 ± 1 713,0a	20 769,9 ± 371,6	79,38 ± 2,61a
1	+	39 766,2 ± 1 605,8b	19 432,6 ± 779,4	93,32 ± 5,33ab
5	+	37 885,5 ± 649,5b	18 543,0 ± 989,7	97,24 ± 4,77b
10	+	36 024,2 ± 1 989,0b	19 585,3 ± 463,0	122,13 ± 2,18c
25	+	39 349,6 ± 2 389,2b	19 806,7 ± 514,4	88,89 ± 6,58ab
50	+	32 899,2 ± 3 698,7b	19 156,4 ± 536,2	102,00 ± 1,33b
100	+	34 697,7 ± 3 306,2b	18 162,2 ± 1 026,2	91,63 ± 11,8ab

Pędy roślin rosnących w pożywce podstawowej opryskiwano roztworem zawierającym FC i KCl. Rośliny kontrolne były spryskiwane wodą dejonizowaną.

Dane są średnimi ±BS ($n = 5$ dla kontroli; $n = 3-4$ dla wariantów eksperymentalnych). Średnie w kolumnach, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$). Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$).

Wyniki zamieszczone w tabeli 5 i 6 pokazują, że oprysk roztworami KCl części nadziemnych gorczycy rosnącej w pożywce podstawowej nie miał istotnego wpływu na zawartość K i Zn oraz obniżał zawartość Ca w pędach. Dodatkowe wprowadzenie do oprysku 10^{-6} M FC obniżało zawartość K i Ca i jednocześnie podnosiło zawartość cynku w pędach.

Akumulacja potasu w pędach gorczycy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn wynosiła 48 218 mg/kg s.m. i niewiele różniła się od akumulacji w pędach roślin kontrolnych (47 338 mg/kg s.m.) (tabela 7). Opryskiwanie części nadziemnych roztworami KCl w stężeniach 1–10 mM nie zmieniało w nich zawartości potasu. Natomiast zastosowanie 50 mM KCl i 100 mM KCl istotnie zwiększało akumulację potasu, która była odpowiednio o 71% i 59% wyższa od zawartości tego pierwiastka w roślinach z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn. Trudna do wyjaśnienia jest mniejsza (o 53%) zawartość K w pędach opryskiwanych 25 mM KCl (tabela 7).

W pędach gorczycy uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn zawartość wapnia wynosiła 21 407 mg/kg s.m. i była prawie taka sama, jak zawartość tego pierwiastka w kontroli (20 770 mg/kg s.m.). Traktowanie pędów KCl, w stęże-

Tabela 7

Wpływ KCl na akumulację K, Ca i Zn [mg/kg s.m.] w pędach gorzycy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

Stężenie KCl [mM]	Zawartość metalu [mg/kg s.m.]		
	K	Ca	Zn
0 (wariant EDTA/Pb/Cd/Zn)	48 218,5 ± 1 987,8a	21 407,5 ± 243,0	193,4 ± 1,8a
1	47 521,5 ± 637,0a	22 094,2 ± 825,6	186,6 ± 6,5ab
5	46 224,2 ± 2 674,5a	22 207,1 ± 1 372,3	184,0 ± 10,7ab
10	44 022,5 ± 6 636,7a	22 109,8 ± 768,3	162,5 ± 12,2bc
25	22 886,2 ± 5 460,6b	15 764,3 ± 6 953,4	151,7 ± 21,5c
50	82 223,9 ± 8 310,4c	16 537,8 ± 799,4	155,0 ± 11,6bc
100	76 678,6 ± 4 167,2c	15 111,0 ± 781,2	197,5 ± 0,6a

Pędy roślin rosnących w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn opryskiwano roztworem KCl. Rośliny z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn były spryskiwane wodą dejonizowaną.

Dane są średnimi ±BS ($n = 5$ dla kontroli; $n = 3-4$ dla wariantów eksperymentalnych). Średnie w kolumnach, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$). Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$).

niach 1–10 mM, nie zmieniało akumulacji Ca, natomiast wyższe stężenia soli potasowej obniżały zawartość wapnia od 23% do 29% w stosunku do wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn, jednak ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi. W odróżnieniu od Ca, zawartość Zn w częściach nadziemnych roślin uprawianych w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn (193,4 mg/kg s.m.) była 2,4 razy większa od oznaczonej w pędach roślin kontrolnych (79,38 mg/kg s.m.). Ten wzrost zawartości Zn prawdopodobnie nie był wyłącznie efektem działania EDTA obecnego w pożywce, ale również rezultatem wzrostu koncentracji tego pierwiastka w roztworze.

Stężenie cynku wynosiło 0,34 μM w pożywce podstawowej i 25,34 μM w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn, czyli było 74 razy wyższe. Opryskanie pędów solą potasową powodowało obniżenie zawartości Zn w porównaniu z wariantem EDTA/Pb/Cd/Zn i zmiany te były statystycznie istotne w roślinach traktowanych 10, 25 lub 50 mM KCl (tabela 7).

Na akumulację potasu w pędach gorzycy uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn wyraźnie stymulujący wpływ miało opryskanie ich 10^{-6} M FC (tabela 8). Od stężenia 10 mM obserwowano stopniowy wzrost akumulacji potasu wraz ze wzrostem stężenia KCl. Jednak istotny statystycznie wpływ na zawartość potasu w pędach zaobserwowano w przypadku 50 mM KCl i 100 mM KCl, kiedy to akumulacja potasu wzrosła odpowiednio o 59% i 75% w porównaniu z roślinami z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn.

Fuzikokcyna w połączeniu z KCl powodowała spadek zawartości wapnia, a po oprysku roztworem zawierającym FC i 5 mM KCl jego zawartość w pędach wynosiła 8 534 mg/kg s.m. Mimo ponownego wzrostu zawartości Ca przy

Tabela 8

Wpływ KCl oraz fuzikokcyny na akumulację K, Ca i Zn [mg/kg s.m.]
w pędach gorczyicy sarepskiej uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin

Stężenie KCl [mM]	Fuzikokcyna [10^{-6} M]	Zawartość metalu [mg/kg s.m.]		
		K	Ca	Zn
0 (wariant EDTA/Pb/Cd/Zn)	—	48 218,5 ± 1 987,8ab	21 407,5 ± 243,0a	193,4 ± 1,8a
1	+	70 057,7 ± 3 197,9bcd	14 128,9 ± 1 440,4bc	147,0 ± 21,7ab
5	+	42 172,4 ± 3 309,0a	8 534,1 ± 552,3c	87,1 ± 7,0c
10	+	54 374,5 ± 8 265,1abc	10 427,9 ± 4 014,7cd	132,4 ± 24,1bc
25	+	58 302,0 ± 5 408,2abc	13 555,1 ± 1 222,2bc	134,5 ± 5,0bc
50	+	76 840,6 ± 1 924,5cd	16 256,5 ± 768,8abd	165,4 ± 8,2ab
100	+	84 498,4 ± 20 307,7d	18 752,5 ± 3 416,1ab	193,6 ± 35,9a

Pędy roślin rosnących w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn opryskiwano roztworem zawierającym FC i KCl. Rośliny z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn były spryskiwane wodą dejonizowaną.

Dane są średnimi ±BS ($n = 5$ dla kontroli; $n = 3-4$ dla wariantów eksperymentalnych). Średnie w kolumnach, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$).

wyższych stężeniach KCl, akumulacja tego pierwiastka nie osiągnęła poziomu obserwowanego w przypadku roślin z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn (tabela 8). Opryskanie pędów gorczyicy 10^{-6} M FC w połączeniu z KCl obniżało także akumulację cynku i wyniki te były istotnie niższe w przypadku roślin traktowanych fuzikokcyną oraz 5 mM, 10 mM i 25 mM KCl (tabela 8).

Zamieszczone w tabeli 7 i 8 wyniki dowodzą, że w pędach gorczyicy rosnącej w pożywce z dodatkiem EDTA/Pb/Cd/Zn tylko akumulacja potasu zmienia się podobnie jak akumulacja Pb i Cd. Wskazywać na to może wpływ EDTA na wzrost pobierania potasu, w przeciwieństwie do Ca i Zn.

4.1.4. Zależność między zawartością Pb, Cd, K, Ca i Zn w pędach gorczyicy sarepskiej a transpiracją

W celu określenia zależności między akumulacją metali w częściach nadziemnych gorczyicy a transpiracją obliczono współczynniki korelacji między zawartością Pb, Cd, K, Ca i Zn w pędach, oznaczoną po 49 godzinach eksperymentu, a ilością wody wytranspirowanej przez rośliny uprawiane w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn. Współczynniki obliczono zarówno dla całkowitej ilości wytranspirowanej wody (po 49 godzinach), jak i dla ilości wody wytranspirowanej po 19, 25, 31 i 35 godzinach od oprysku roślin. Pod uwagę wzięto krótsze czasy, ponieważ w początkowym okresie eksperymentu stwierdzono największe

różnice w wielkości transpiracji między roślinami z poszczególnych wariantów doświadczeń (rys. 4).

Zaobserwowano dodatnią korelację między zawartością Pb a całkowitą ilością wytranspirowanej wody (po 49 godzinach) przez gorczycę opryskiwaną KCl. Wartość współczynnika była jednak niska (0,28) i nieistotna statystycznie. Natomiast współczynniki korelacji obliczone po krótszym czasie uprawy roślin (19—35 godzin) były ujemne i również nieistotne statystycznie (tabela 9).

Tabela 9

Współczynniki korelacji między zawartością metali* w pędach gorczycy [mg/kg s.m.] uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin a ilością wytranspirowanej wody [ml/g ś.m.] po 19, 25, 31, 35 i 49 godzinach od momentu opryskania roślin KCl [1—100 mM]

Ilość wytranspirowanej wody	Współczynniki korelacji				
	Pb	Cd	K	Ca	Zn
Po 19 godzinach	-0,29	-0,28	0,08	-0,02	-0,18
Po 25 godzinach	-0,18	-0,17	0,24	-0,06	-0,20
Po 31 godzinach	-0,11	-0,10	0,31	-0,01	-0,16
Po 35 godzinach	-0,26	-0,13	0,03	-0,47	-0,18
Po 49 godzinach	0,28	0,30	0,21	-0,48	-0,02

* Zawartość metali w pędach oznaczano tylko raz, po 49 godzinach uprawy w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn. Pogrubioną czcionką zaznaczono współczynniki korelacji istotne statystycznie ($p \leq 0,05$).

Podobne zależności wykazano dla Cd (tabela 9). Sugeruje to występowanie niskiej, dodatniej korelacji między całkowitą ilością wytranspirowanej wody (po 49 godzinach) a akumulacją tych metali w pędach gorczycy po opryskaniu ich chlorkiem potasu.

Obliczone współczynniki korelacji dla K były dodatnie, ale niskie, nieistotne statystycznie i nie wykazywały żadnych tendencji. W przypadku Ca i Zn stwierdzono ujemne korelacje lub ich brak (współczynnik $<0,19$) między akumulacją tych pierwiastków w częściach nadziemnych a transpiracją, przy czym należy podkreślić, że dla wapnia współczynnik korelacji był istotny statystycznie po 35 godzinach i 49 godzinach (tabela 9). Świadczy to o tym, że pobieranie i transport Ca i Zn do pędów są odmienne od pobierania i transportu potasu.

W odróżnieniu od zastosowania do oprysku tylko KCl, traktowanie pędów 10^{-6} M FC + KCl skutkowało zarówno istotnym statystycznie wzrostem transpiracji w początkowych godzinach eksperymentu (rys. 4), jak i większą, całkowitą ilością wytranspirowanej wody w stosunku do roślin z wariantu EDTA/Pb/Cd/Zn (rys. 8). Z tego też względu obliczono współczynniki korelacji między zawartością metali w pędach, oznaczoną po 49 godzinach eksperymentu, a ilością wytranspirowanej wody po 19, 25, 31, 35 i 49 godzinach od momentu spryskania pędów roztworami zawierającymi FC + KCl. Dla Cd stwierdzono dodatnią i istotną statystycznie korelację między zawartością tego metalu

w pędach a wielkością transpiracji, począwszy od godziny 19. aż do 35. godziny od momentu opryskania pędów fuzikokcyną i KCl (tabela 10).

Tabela 10

Współczynniki korelacji między zawartością metali* w pędach gorczycy [mg/kg s.m.] uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin a ilością wytranspirowanej wody [ml/g ś.m.] po 19, 25, 31, 35 i 49 godzinach od momentu opryskania roślin 10^{-6} M FC + KCl (1—100 mM)

Ilość wytranspirowanej wody	Współczynniki korelacji				
	Pb	Cd	K	Ca	Zn
Po 19 godzinach	0,31	0,43	0,24	-0,32	-0,43
Po 25 godzinach	0,35	0,46	0,22	-0,33	-0,41
Po 31 godzinach	0,34	0,46	0,19	-0,32	-0,40
Po 35 godzinach	0,34	0,49	0,19	-0,32	-0,38
Po 49 godzinach	0,25	0,19	-0,01	-0,60	-0,40

* Zawartość metali w pędach oznaczano tylko raz, po 49 godzinach uprawy w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn. Pogrubioną czcionką zaznaczono współczynniki korelacji istotne statystycznie ($p \leq 0,05$).

Znacznie słabszą zależność, ale również dodatnią, stwierdzono między ilością wytranspirowanej wody a akumulacją Pb. Obliczone dla Pb współczynniki korelacji wykazały podobne tendencje, chociaż korelacje były nieistotne statystycznie (tabela 10). Może to świadczyć o tym, że w przypadku roślin opryskanych FC + KCl akumulacja Pb i Cd w pędach gorczycy zależała przede wszystkim od zmian w wielkości transpiracji w ciągu pierwszych 20—35 godzin od traktowania pędów, a w znacznie mniejszym stopniu od całkowitej ilości wody wytranspirowanej w ciągu 49 godzin eksperymentu.

W przypadku potasu stwierdzono brak korelacji między całkowitą ilością wytranspirowanej wody (po 49 godzin) oraz słabą, dodatnią i nieistotną statystycznie korelację w czasie od 19. godziny do 35. godziny od momentu opryskania pędów. Dla Ca i Zn współczynniki były ujemne i dla Zn po 19 godzinach oraz Ca po 49 godzinach istotne statystycznie (tabela 10). Sugeruje to, że akumulacja Ca i Zn w pędach zmniejszała się wraz ze wzrostem transpiracji. Natomiast w przypadku K stwierdzono bardzo słabą dodatnią zależność między transpiracją a zawartością K w pędach.

Obliczono także współczynniki korelacji między zawartością metali w pędach gorczycy uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin a stężeniem KCl użytym do opryskania pędów. Jeśli chodzi o rośliny traktowane wyłącznie różnymi stężeniami KCl, to stwierdzono dodatnią korelację w przypadku Pb i Cd, przy czym dla kadmu była ona wysoka i istotna statystycznie (tabela 11). Istotne statystycznie korelacje obliczono także dla K i Ca. Dla pierwszego z tych pierwiastków była ona dodatnia, a dla drugiego — ujemna. Natomiast zawartość Zn w pędach nie wykazywała żadnej zależności od stężenia KCl zastosowanego do oprysku.

Tabela 11

Współczynniki korelacji między zawartością metali w pędach gorczycy [mg/kg s.m.] uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin a stężeniem KCl (1—100 mM) zastosowanym do opryskania pędów

Współczynniki korelacji				
Pb	Cd	K	Ca	Zn
0,35	0,78	0,62	-0,52	0,03

Pogrubioną czcionką zaznaczono współczynniki korelacji istotne statystycznie ($p \leq 0,05$).

Dodatnią i istotną statystycznie wartość współczynnika korelacji stwierdzono między akumulacją Pb w częściach nadziemnych a stężeniem KCl użytym do oprysku wraz z 10^{-6} M FC (tabela 12). Także dla Cd i K wykazano wysoką i dodatnią korelację, natomiast zawartość Ca i Zn w pędach gorczycy nie zależała w istotny sposób od stężenia KCl, którym wraz z 10^{-6} M FC traktowano pędy. Dane zaprezentowane w tabeli 11 i 12 wskazują, że sól potasowa ma duży wpływ na wielkość akumulacji Pb, Cd i K w częściach nadziemnych, który prawdopodobnie jest niezależny od transpiracji.

Podsumowując przedstawione wyniki, można stwierdzić, że akumulacja Pb i Cd w pędach gorczycy uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn i traktowanej 10^{-6} M FC + KCl jest dodatnio skorelowana z wielkością transpiracji. Na zależność tę większy wpływ ma nie całkowita ilość wytranspirowanej wody, ale przejściowe zmiany w intensywności transpiracji w początkowym okresie działania FC i KCl.

Tabela 12

Współczynniki korelacji między zawartością metali w pędach gorczycy [mg/kg s.m.] uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn przez 49 godzin a stężeniem KCl (1—100 mM) zastosowanym do opryskania pędów wraz z 10^{-6} M FC

Współczynniki korelacji				
Pb	Cd	K	Ca	Zn
0,72	0,67	0,62	0,20	0,31

Pogrubioną czcionką zaznaczono współczynniki korelacji istotne statystycznie ($p \leq 0,05$).

Akumulacja K, Ca lub Zn w pędach roślin uprawianych w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn zachodzi w sposób odmienny od akumulacji badanych pierwiastków toksycznych. Prawdopodobnie wynika to z różnego sposobu przemieszczania się metali w poprzek korzenia, załadunku ksylemu i transportu w ksylemie. Dodatnie i wysokie korelacje między stężeniem KCl zastosowanym do oprysku a zawartością Pb i Cd w pędach wskazują na dużą rolę soli potasowej w stymulacji pobierania i akumulacji obu metali w częściach nadziemnych, która prawdopodobnie jest niezależna od intensywności transpiracji.

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

Doświadczenia wazonowe przeprowadzono na podstawie wyników eksperymentów w kulturach hydroponicznych, które wykazały dodatnią korelację zarówno między transpiracją a akumulacją Pb i Cd w pędach roślin opryskanych FC + KCl, jak również między zawartością obu metali w pędach a stężeniem KCl użytego do oprysku. W związku z tym celem kolejnych badań było sprawdzenie, czy traktowanie pędów związkami stymulującymi transpirację (FC, FC + KCl) lub samym KCl, bez i po wprowadzeniu EDTA do gleby, zwiększy akumulację obu metali toksycznych w częściach nadziemnych roślin uprawianych w zanieczyszczonej metalami glebie. W doświadczeniach tych nie oznaczano zawartości K, Ca i Zn, ponieważ badania hydroponiczne wykazały odmiennie zależności między akumulacją tych pierwiastków w pędach gorczycy sarepskiej a akumulacją Pb i Cd w odpowiedzi na podanie EDTA do pożywki oraz oprysk FC i/lub KCl.

Spośród przetestowanych stężeń KCl wybrano 25 mM, mimo że stosując 50 mM KCl i 100 mM KCl oraz FC stwierdzano większą akumulację Pb i Cd w pędach roślin uprawianych w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn. Powodem było zawiązanie się i zasychanie brzegów liści obserwowane u gorczycy sarepskiej rosnącej w glebie, której pędy opryskiwano 10^{-6} M FC i 50 mM lub 100 mM KCl. Wykazano to w czasie pilotażowych doświadczeń poprzedzających właściwe badania. Brak opisanej reakcji stresowej w przypadku roślin uprawianych w hydroponikach mógł wynikać z krótszego czasu trwania doświadczeń (49 godzin) lub/i nieograniczonej możliwości pobierania wody w porównaniu z roślinami rosnącymi w glebie.

Badano także wpływ traktowania pędów ABA oraz glifosatem (Glif) na akumulację Pb i Cd w pędach. ABA zastosowano jako fitohormon powodujący zamykanie szparek i hamowanie transpiracji, zakładając, że jego działanie zmniejszy pobieranie i akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych. Glifosat użyto jako dodatkowy czynnik indukujący hyperakumulację i zwiększający efektywność EDTA. Ponieważ herbicyd ten hamuje transpirację roślin, jego działanie jako czynnika indukującego nie powinno być związane z tym procesem. Doświadczenia przeprowadzono z gorczycą sarepską 'PHYTO 426' i słonecznikiem 'LECH', biorąc pod uwagę konieczność doboru gatunków do zastosowania płodozmianu w przypadku prowadzenia fitoekstrakcji indukowanej w warunkach polowych.

4.2.1. Wpływ FC, KCl, ABA i EDTA na transpirację

W badaniach zastosowano glebę zanieczyszczoną Pb, Cd i Zn pobraną z okolic huty cynku i ołowiu. Skład granulometryczny pozwolił zaliczyć ją do pyłu gliniastego. Pozostałe właściwości gleby zamieszczono w tabeli 13.

Tabela 13

Właściwości gleby

Badany parametr	Wartość parametru
pH [KCl]	6,94
Przewodnictwo elektryczne [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	145,0
N [%]	0,144
K ₂ O [mg/100 g]	14,6
P ₂ O ₅ [mg/100 g]	15,3
Pb [mg/kg s.m.]	558,1
Cd [mg/kg s.m.]	11,0
Zn [mg/kg s.m.]	727,2

4.2.1.1. Dynamika zmian transpiracji

Gorzycza sarepska 'Phyto 426'

Pięć pierwszych spośród prezentowanych w tabeli 14 wariantów doświadczeń dotyczy roślin, którym do gleby zanieczyszczonej Pb, Cd i Zn nie podawano EDTA. Po 24 godzinach od potraktowania pędów gorzycy sarepskiej 'Phyto 426' roztworem 10^{-6} M FC ilość wytranspirowanej wody była o 64% większa w stosunku do kontroli (tabela 14). Również istotnie większą, w porównaniu z kontrolą, transpirację wykazały rośliny traktowane 10^{-6} M FC + 25 mM KCl. Jednak ilość wytranspirowanej wody była tylko o 39% większa niż w przypadku kontroli, tak więc nie obserwowano synergistycznego działania obu związków.

Opryskanie pędów gorzycy 10^{-5} M ABA zmniejszyło ilość wytranspirowanej wody o 25% w porównaniu z kontrolą, ale różnica ta była nieistotna statystycznie. Także 25 mM KCl nie zmieniło istotnie transpiracji w ciągu 24 godzin od opryskania pędów (tabela 14). W drugim dniu od opryskania pędów 10^{-6} M FC lub 10^{-6} M FC + 25 mM KCl nadal widoczny był stymulujący wpływ tych substancji na transpirację. Była ona wyższa niż w kontroli odpowiednio o 37% i 35%, jednak różnice te nie były już istotne statystycznie. Brak istotnych staty-

T a b e l a 14
Wpływ FC, KCl, ABA oraz EDTA na dynamikę zmian ilości wytranspirowanej wody przez gorczyce sarepską rosnącą w glebie przez 7 dni

Wariant	Ilość wytranspirowanej wody [ml/g ś.m.] w poszczególnych dniach						
	1	2	3	4	5	6	7
Kontrola	6,79 ± 0,35abcd	6,00 ± 0,28ab	6,39 ± 0,21	7,00 ± 0,34	8,12 ± 0,18	9,06 ± 0,42abc	6,41 ± 0,25a
10 ⁻⁶ M FC	11,12 ± 0,76f	8,24 ± 0,71bc	7,62 ± 0,56	7,78 ± 0,57	10,56 ± 0,56	9,52 ± 0,31abcd	7,74 ± 0,32ab
25 mM KCl	5,79 ± 0,52ab	6,34 ± 0,33ab	6,80 ± 0,40	6,68 ± 0,43	10,83 ± 0,81	8,68 ± 0,60ab	6,39 ± 0,52a
10 ⁻⁵ M ABA	5,08 ± 0,31ab	5,95 ± 0,41ab	6,27 ± 0,37	7,23 ± 0,61	9,32 ± 0,61	7,86 ± 0,60a	5,67 ± 0,36a
10 ⁻⁶ M FC + 25 mM KCl	9,41 ± 0,93ef	8,12 ± 0,74bc	7,68 ± 0,74	8,54 ± 1,01	11,11 ± 1,10	9,88 ± 1,08abcd	6,90 ± 0,68a
5 mmoli EDTA/kg	7,34 ± 0,97bcde	7,99 ± 0,69abc	9,31 ± 0,76	8,08 ± 0,71	8,11 ± 0,85	13,72 ± 1,36e	11,05 ± 1,05c
5 mmoli EDTA/kg + 10 ⁻⁶ M FC	9,08 ± 1,62def	9,57 ± 1,75c	9,60 ± 1,41	8,42 ± 1,08	8,41 ± 0,95	14,28 ± 1,34e	12,05 ± 1,28c
5 mmoli EDTA/kg + 25 mM KCl	6,04 ± 0,54abc	7,72 ± 0,56abc	8,71 ± 0,72	8,04 ± 0,54	8,23 ± 0,75	13,31 ± 1,57de	11,77 ± 1,40c
5 mmoli EDTA/kg + 10 ⁻⁶ M FC + 25 mM KCl	8,39 ± 1,37cd	8,01 ± 1,45bc	7,68 ± 1,29	6,81 ± 1,24	8,16 ± 1,71	12,13 ± 2,57bcde	10,78 ± 2,25c
5 mmoli EDTA/kg + 10 ⁻⁵ M ABA	4,64 ± 0,27a	5,52 ± 0,37a	7,83 ± 0,70	7,18 ± 0,38	8,72 ± 0,49	12,68 ± 1,85cde	10,39 ± 0,67bc

Dane są średnimi ±BS ($n = 6$). Średnie w kolumnach, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystycznie sposób (test NTR, $p \leq 0,05$). Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$).

stycznie różnic w stosunku do kontroli stwierdzono po 48 godzinach również w przypadku roślin traktowanych ABA i KCl. Począwszy od 3. aż do 7. dnia nie wykazano istotnych statystycznie różnic między ilością wytranspirowanej wody przez rośliny kontrolne a ilością wytranspirowanej wody przez rośliny pozostałych 4 wariantów doświadczeń. Uzyskane rezultaty wskazują, że w glebie zanieczyszczonej Pb i Cd opryskanie pędów FC stymuluje transpirację w porównaniu z kontrolą, ale działanie tego związku jest krótkotrwałe i — podobnie jak w kulturach hydroponicznych — po 48 godzinach zanika. Równoczesne podanie FC i KCl nie zwiększa stymulującego wpływu fuzikokcyny na transpirację. Natomiast traktowanie części nadziemnych ABA nie powoduje istotnego zmniejszenia transpiracji, nawet w ciągu pierwszych 24 godzin po oprysku.

W przypadku gorczycy sarepskiej po 24 godzinach od wprowadzenia EDTA do gleby (wariant EDTA) nie obserwowano spadku transpiracji w stosunku do kontroli (tabela 14). W 2. i 3. dniu od podania związku kompleksującego do gleby stwierdzono nawet wzrost ilości wytranspirowanej wody odpowiednio o 33% i 46% w porównaniu z kontrolą, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. W ciągu 4. i 5. dnia transpiracja w obu wariantach była podobna, natomiast w 6. i 7. dniu obserwowano istotny statystycznie wzrost transpiracji w stosunku do roślin kontrolnych, odpowiednio o 51% i 72% (tabela 14).

Opryskanie pędów fuzikokcyną po wprowadzeniu EDTA do gleby (EDTA + FC) powodowało po 24 godzinach wyższą o 24%, a po 48 godzinach wyższą o 20% transpirację w stosunku do roślin z wariantu EDTA, jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Natomiast potraktowanie nadziemnych części roślin ABA po 24 godzinach doprowadziło do wyraźnego obniżenia transpiracji w porównaniu z wariantem z EDTA. Działanie ABA było jeszcze istotne statystycznie ($p < 0,051$) po 48 godzinach od opryskania pędów. Wzrost transpiracji gorczycy rosnącej w obecności EDTA w 6. i 7. dniu eksperymentu zaobserwowano również po dodatkowym traktowaniu pędów związkami chemicznymi (FC, KCl, ABA) (tabela 14). Wyniki doświadczeń wskazują więc, że wzrost transpiracji w 6. i 7. dniu jest efektem działania EDTA, a nie regulatorów wzrostu lub KCl.

Przedstawione dane pokazują, że wprowadzenie EDTA (5 mmoli/kg) do gleby nie obniża transpiracji gorczycy. Opryskanie pędów FC powoduje niewielki i przejściowy (do 49 godzin) wzrost transpiracji, co świadczy o tym, że po podaniu EDTA do gleby regulator roślinny może stymulować akumulację Pb i Cd. Traktowanie pędów KCl, w odróżnieniu od badań w kulturach hydroponicznych, nie miało żadnego wpływu na transpirację gorczycy rosnącej w glebie, do której wprowadzono EDTA. Natomiast opryskanie pędów ABA istotnie obniżało transpirację w ciągu pierwszych 48 godzin, co powinno być związane z niższą akumulacją Pb i Cd w częściach nadziemnych.

Tabela 15
Wpływ FC, KCl, ABA oraz EDTA na dynamikę zmian ilości wytranspirowanej wody przez słonecznik rosnący w glebie przez 7 dni

Wariant	Ilość wytranspirowanej wody [ml/g ś.m.] w poszczególnych dniach						
	1	2	3	4	5	6	7
Kontrola	4,69 ± 0,26	4,89 ± 0,25bcd	4,74 ± 0,26	5,68 ± 0,36cd	8,08 ± 0,54d	6,05 ± 0,60	4,32 ± 0,43
10 ⁻⁶ M FC	5,09 ± 0,68	5,93 ± 0,69d	5,77 ± 0,85	6,56 ± 0,81d	8,35 ± 0,95d	7,01 ± 1,03	4,85 ± 0,79
25 mM KCl	4,17 ± 0,56	4,54 ± 0,46abcd	4,08 ± 0,34	4,93 ± 0,48bc	6,11 ± 0,57bc	5,00 ± 0,43	3,42 ± 0,26
10 ⁻⁵ M ABA	4,25 ± 0,72	5,34 ± 0,78cd	5,18 ± 0,72	5,89 ± 0,73cd	7,42 ± 0,66cd	6,04 ± 0,49	4,15 ± 0,43
10 ⁻⁶ M FC + 25 mM KCl	3,87 ± 0,25	4,51 ± 0,27abcd	3,98 ± 0,37	4,97 ± 0,54bc	6,09 ± 0,58abc	5,06 ± 0,75	3,52 ± 0,50
5 mmoli EDTA/kg	4,54 ± 0,32	3,85 ± 0,50ab	4,11 ± 0,44	3,80 ± 0,61ab	4,42 ± 0,78ab	6,40 ± 0,75	5,35 ± 0,89
5 mmoli EDTA/kg + 10 ⁻⁶ M FC	5,36 ± 0,60	3,92 ± 0,59abc	4,44 ± 0,70	3,91 ± 0,55ab	4,97 ± 0,67ab	6,32 ± 0,77	4,68 ± 0,46
5 mmoli EDTA/kg + 25 mM KCl	5,83 ± 0,85	3,86 ± 0,65ab	4,30 ± 0,41	3,97 ± 0,38ab	4,66 ± 0,63ab	6,80 ± 0,89	4,85 ± 0,59
5 mmoli EDTA/kg + 10 ⁻⁶ M FC + 25 mM KCl	4,90 ± 0,35	3,69 ± 0,35ab	4,15 ± 0,37	2,94 ± 0,47a	4,61 ± 0,27ab	6,16 ± 0,40	4,78 ± 0,49
5 mmoli EDTA/kg + 10 ⁻⁵ M ABA	4,30 ± 0,51	3,19 ± 0,24a	3,68 ± 0,28	3,02 ± 0,38a	4,29 ± 0,43a	5,64 ± 0,64	4,66 ± 0,54

Dane są średnimi ±BS (n = 6). Średnie w kolumnach, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystycznie sposób (test NIR, p ≤ 0,05). Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi (p ≤ 0,05).

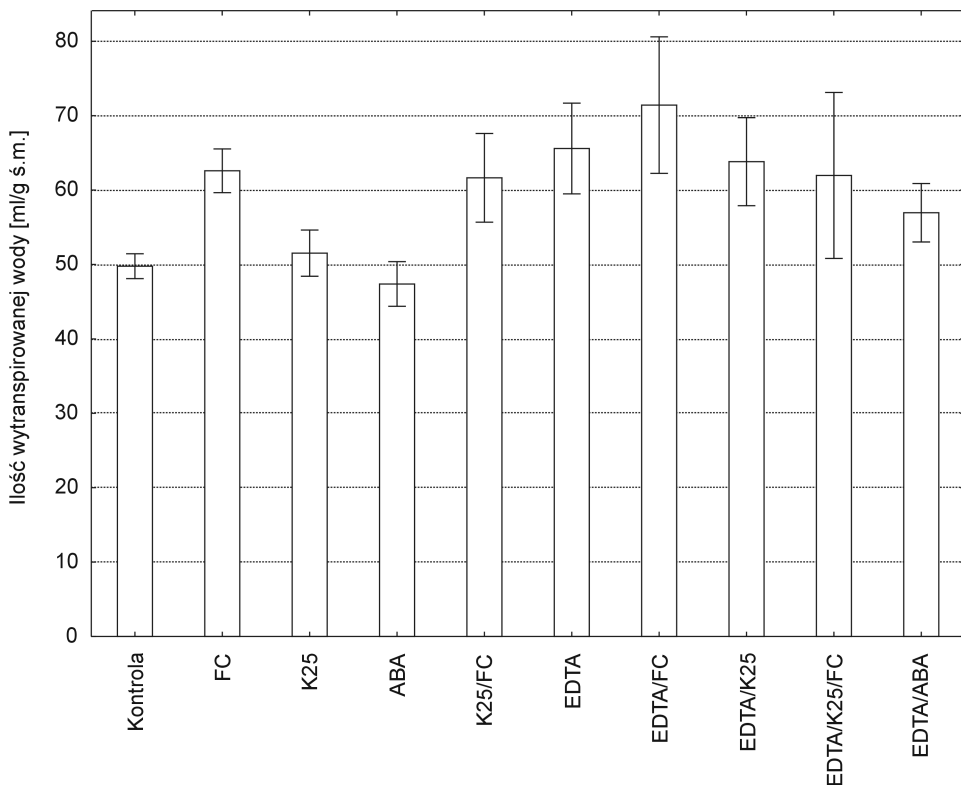
Słonecznik 'LECH'

Słonecznik, w porównaniu z gorzycą, charakteryzował się mniejszą ilością wytranspirowanej wody w przeliczeniu na jednostkę świeżej masy pędów (tabela 15). Opryskiwanie części nadziemnych badanymi związkami chemicznymi (FC, ABA, KCl) nie powodowało w ciągu pierwszych 48 godzin istotnych statystycznie zmian w transpiracji w porównaniu z kontrolą i taka tendencja utrzymywała się do końca doświadczenia. Wprowadzenie EDTA do gleby wywołało u słonecznika spadek transpiracji, począwszy od 2. aż do 5. dnia doświadczenia, przy czym wyraźnie niższą transpirację w stosunku do kontroli stwierdzono tylko w 4. i 5. dniu, odpowiednio o 33% i 45%. Traktowanie pędów FC, KCl, ABA lub FC + KCl, po podaniu EDTA do gleby, nie miało wpływu na zmiany transpiracji w stosunku do roślin z wariantu EDTA. W przypadku słonecznika, w odróżnieniu od gorzycy, nie stwierdzono wzrostu transpiracji w porównaniu z kontrolą w 6. i 7. dniu od wprowadzenia związku chelatującego do gleby (tabela 15).

Podsumowując przedstawione wyniki dotyczące dynamiki zmian transpiracji, można stwierdzić, że oba gatunki reagują w odmienny sposób. Traktowanie pędów gorzycy FC zwiększa istotnie transpirację w roślinach rosnących w glebie zanieczyszczonej Pb i Cd, ale podobnie jak to obserwowano w badaniach hydroponicznych, efekt ten jest krótkotrwały i zanika po 48 godzinach. Traktowanie części nadziemnych FC, po podaniu EDTA do gleby, zwiększa w niewielkim stopniu transpirację, natomiast opryskanie pędów ABA znacznie obniża ten proces, w stosunku do roślin z wariantu EDTA, w ciągu pierwszych 48 godzin. Taka reakcja gorzycy na FC i ABA mogłaby być związana odpowiednio ze wzrostem lub spadkiem akumulacji Pb i Cd w pędach, po wprowadzeniu związku chelatującego do gleby. Nie stwierdzono, aby KCl podany razem z FC zwiększał efektywność działania fuzikocyny na transpirację. Słonecznik, w odróżnieniu od gorzycy, nie reagował istotnymi statystycznie zmianami transpiracji na żaden z zastosowanych oprysków. Można więc stwierdzić, że gorzycza jest gatunkiem podatnym na modyfikowanie transpiracji badanymi związkami chemicznymi w obecności EDTA w glebie. Nie potwierdzono takiej możliwości w przypadku słonecznika.

4.2.1.2. Całkowita ilość wytranspirowanej wody

Rysunek 13 przedstawia całkowitą ilość wody wytranspirowanej przez gorzycę sarepską w trakcie 7 dni doświadczenia. W przypadku roślin traktowanych FC lub FC + KCl transpiracja wzrastała o około 25% w porównaniu z kontrolą. Wprowadzenie związku kompleksującego do gleby zwiększało ilość wytranspirowanej wody o 32% w stosunku do kontroli. Opryskanie pędów FC

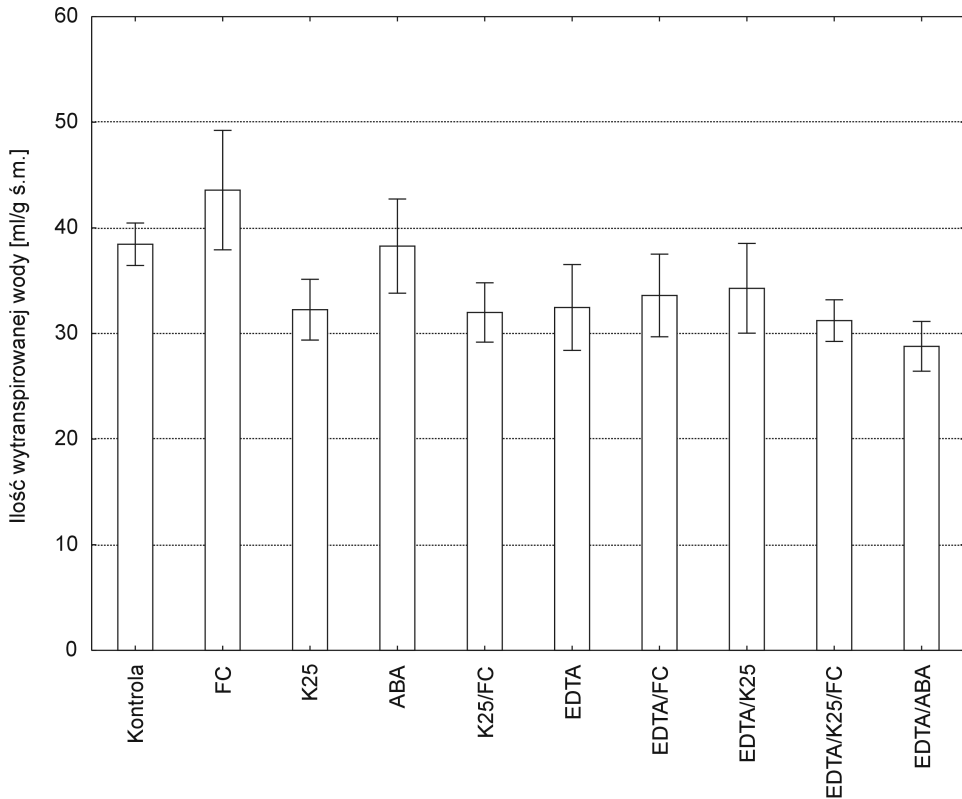


Rys. 13. Wpływ opryskania pędów FC, KCl lub ABA oraz podania EDTA do gleby na całkowitą ilość wody wytranspirowanej przez gorzycę sarepską w ciągu 7 dni

K25 — 25 mM KCl; FC — 10^{-6} M fuzikokcyny. Przedstawione wyniki są średnimi \pm BS ($n = 6$). Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$)

lub ABA, po wprowadzeniu wersenianu do gleby, odpowiednio zwiększało o 9% lub zmniejszało o 6% całkowitą ilość wytranspirowanej wody w stosunku do roślin z wariantu EDTA. Mimo dość znacznych różnic w całkowitej ilości wody wytranspirowanej przez rośliny z poszczególnych wariantów doświadczenia, ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p < 0,05$).

W przypadku słonecznika obserwowano wyższą transpirację jedynie pod wpływem opryskiwania pędów fuzikokcyną, ale całkowita ilość wytranspirowanej wody była tylko o 13% większa w odniesieniu do kontroli i nieistotna statystycznie (rys. 14). Obecność związku chelatującego w glebie nie zwiększała transpiracji, tak jak to obserwowano u gorzycy. Opryskanie pędów słonecznika badanymi związkami chemicznymi w obecności EDTA w glebie nie miało istotnego wpływu na całkowitą ilość wytranspirowanej wody w porównaniu z roślinami z wariantu EDTA (rys. 14).



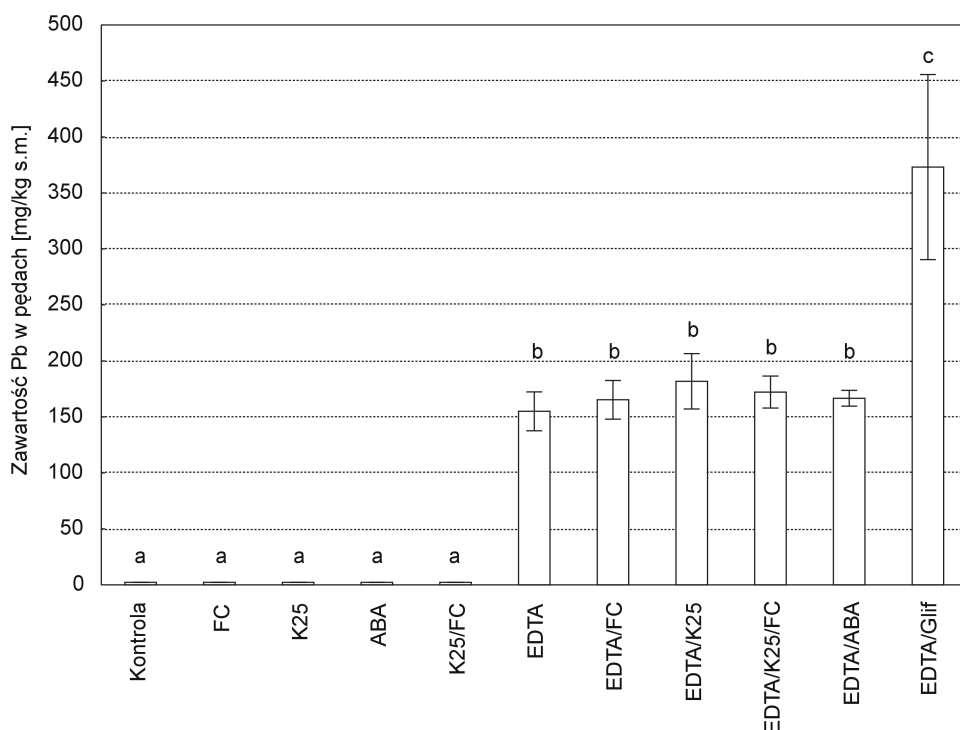
Rys. 14. Wpływ opryskania pędów FC, KCl lub ABA oraz podania EDTA do gleby na całkowitą ilość wytranspirowanej wody przez słonecznik w ciągu 7 dni

K25 — 25 mM KCl; FC — 10^{-6} M fuzikokcyny. Przedstawione wyniki są średnimi \pm BS ($n = 6$). Brak liter przy średnich oznacza, że ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi ($p \leq 0,05$)

Na podstawie całkowitej ilości wytranspirowanej wody można stwierdzić, że fuzikokcyna zwiększa w niewielkim stopniu transpirację gorzycy, a wprowadzenie EDTA do gleby znosi stymulujący wpływ FC na transpirację. Obecność związku chelatującego w podłożu zwiększa całkowitą ilość wody wytranspirowanej przez gorzycę, czego nie zaobserwowano w przypadku słonecznika, u którego transpiracja, w przeliczeniu na świeżą masę, była prawie o 50% mniejsza. Takie wyniki mogą wskazywać na większą zdolność gorzycy do akumulacji Pb i Cd w pędach po indukcji hyperakumulacji.

4.2.2. Wpływ FC, KCl, ABA, EDTA i glifosatu (Glif) na akumulację Pb i Cd

Zawartość Pb w pędach gorczycy sarepskiej kształtowała się poniżej progu oznaczalności ($< 2,28$ mg/kg) we wszystkich wariantach doświadczeń przeprowadzonych bez obecności EDTA w glebie (rys. 15). Dodanie związku kompleksującego do gleby powodowało 68-krotny wzrost zawartości Pb w pędach (155 mg/kg s.m). Opryskanie pędów związkami modyfikującymi transpirację w niewielkim stopniu zwiększało akumulację Pb (7—17%) w stosunku do roślin z wariantu EDTA, przy czym różnice były nieistotne statystycznie. Należy jednak zaznaczyć, że największy (17%) wzrost zawartości Pb stwierdzono w pędach roślin traktowanych 25 mM KCl (rys. 15), w przypadku których całkowita ilość wytranspirowanej wody była taka sama, jak w przypadku roślin rosnących tylko w obecności EDTA (rys. 13). Opryskanie pędów gorczycy glifosatem wywołało bardzo wysoką akumulację Pb w pędach, ponad 2-krotnie

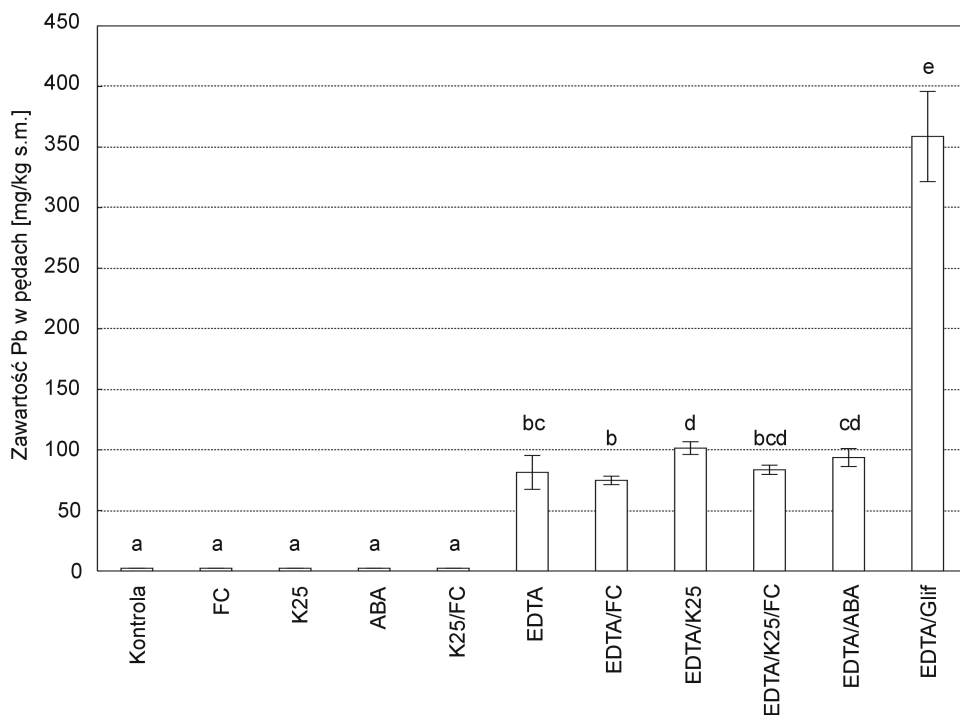


Rys. 15. Wpływ opryskania pędów FC, KCl, ABA lub glifosatem (Glif) oraz podania EDTA do gleby na zawartość Pb w pędach gorczycy sarepskiej

K25 — 25 mM KCl; FC — 10^{-6} M fuzikokcyny. Przedstawione wyniki są średnimi \pm BS ($n = 6$). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)

większą niż w wariacie EDTA. Świadczy to o tym, że glifosat w istotny sposób wzmacnia efektywność związku chelatującego, przy równoczesnym silnym hamowaniu transpiracji (por. rozdz. 3.1.3.3).

Podobnie jak w przypadku gorczycy, zawartość Pb w pędach słonecznika była poniżej progu oznaczalności (< 2,28 mg/kg) we wszystkich wariantach doświadczeń, w których nie wprowadzono EDTA do gleby (rys. 16). Podanie wersenianu do gleby zwiększyło 36-krotnie zawartość Pb (81 mg/kg s.m) w częściach nadziemnych w stosunku do kontroli. Opryskanie pędów słonecznika FC lub FC + KCl nie miało wpływu na akumulację Pb, podczas gdy podanie ABA zwiększyło zawartość tego metalu o 15% w stosunku do roślin z wariantu EDTA, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie.



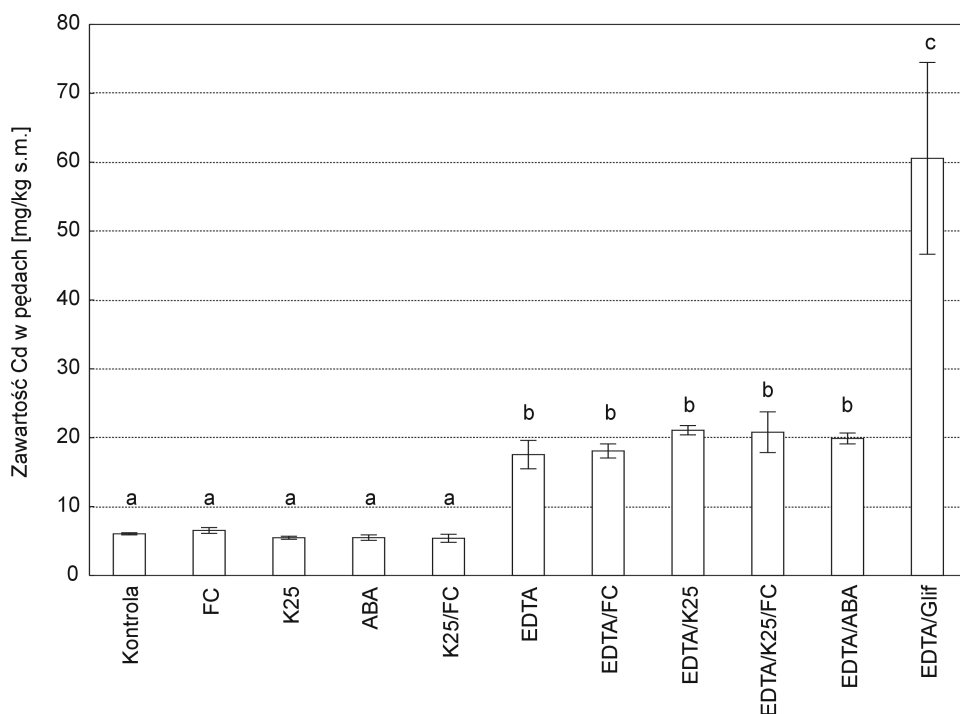
Rys. 16. Wpływ opryskania pędów FC, KCl, ABA lub glifosatem (Glif) oraz podania EDTA do gleby na zawartość Pb w pędach słonecznika

K25 — 25 mM KCl; FC — 10^{-6} M fuzikokcyny. Przedstawione wyniki są średnimi \pm BS ($n = 6$). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)

Opryskanie pędów KCl zwiększyło natomiast w istotny statystycznie sposób zawartość Pb w częściach nadziemnych słonecznika; była ona o 25% wyższa od zawartości w roślinach z wariantu EDTA. Traktowanie pędów glifosatem znacznie zwiększyło działanie wersenianu i dało prawie 4,5-krotny wzrost akumulacji Pb w porównaniu z wariantem z EDTA (rys. 16).

Zawartość Cd w pędach gorczycy uprawianej na zanieczyszczonej glebie bez EDTA wynosiła od 5,40 mg/kg (K25/FC) do 6,54 mg/kg (FC) i różnice te były nieistotne statystycznie (rys. 17). Dodanie EDTA do podłoża spowodowało ponad 2-krotny wzrost zawartości kadmu w pędach (17,55 mg/kg) w porównaniu z kontrolą. Po zastosowaniu modyfikatorów transpiracji (FC, KCl, ABA) do opryskania pędów roślin rosnących w obecności związku chelatującego w glebie nie zaobserwowano istotnych zmian w zawartości Cd w częściach nadziemnych w stosunku do roślin z wariantu EDTA. Natomiast opryskanie pędów gorczycy glifosatem, jako czynnikiem wspomagającym indukcję hiperakumulacji, spowodowało wyraźny wzrost akumulacji kadmu. Była ona 2,5 razy większa od zawartości Cd w pędach roślin rosnących w glebie zawierającej wersenian i aż 10 razy większa niż w roślinach kontrolnych (gleba bez EDTA) (rys. 17).

W pędach słonecznika rosnącego na zanieczyszczonej glebie bez dodatku EDTA zawartość kadmu wynosiła poniżej 10 mg/kg s.m., a opryskiwanie pędów modyfikatorami transpiracji, podobnie jak w przypadku gorczycy, nie miało istotnego wpływu na akumulację Cd (rys. 18). Również zawartość tego pierwiastka w częściach nadziemnych była podobna i wynosiła od 5,56 mg/kg

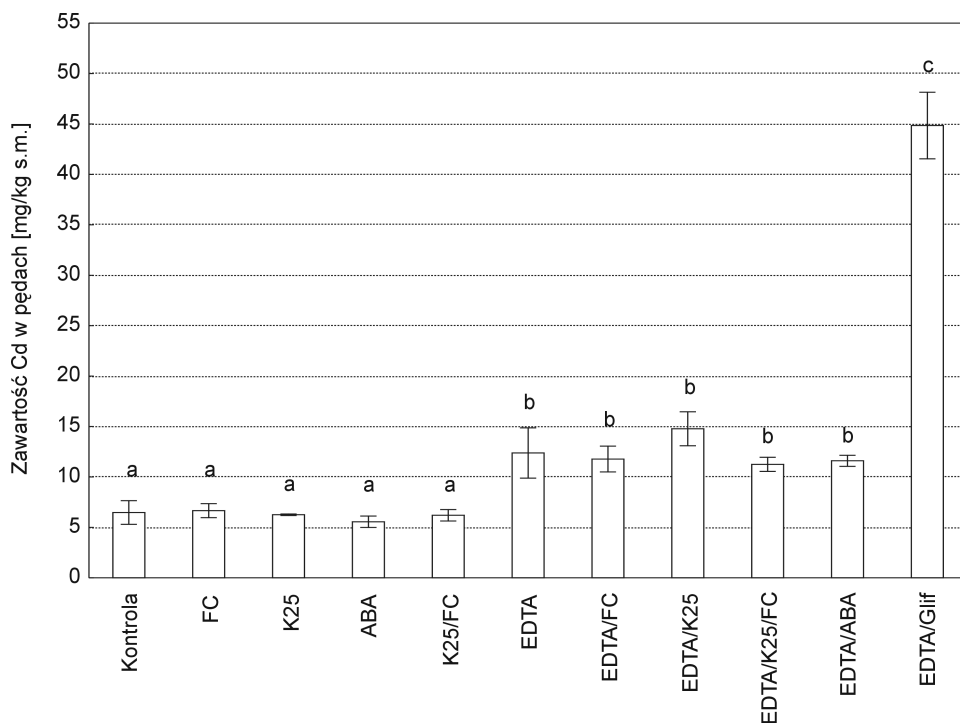


Rys. 17. Wpływ opryskania pędów FC, KCl, ABA lub glifosatem (Glif) oraz podania EDTA do gleby na zawartość Cd w pędach gorczycy sarepskiej

K25 — 25 mM KCl; FC — 10^{-6} M fuzikokcyny. Przedstawione wyniki są średnimi \pm BS ($n = 6$). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)

(ABA) do 6,66 mg/kg (FC). Podanie EDTA do gleby zwiększyło prawie 2-krotnie akumulację Cd w pędach. Podobnie jak w przypadku gorczycy, zastosowanie modyfikatorów transpiracji w obecności związku chelatującego w glebie nie spowodowało istotnych zmian w zawartości Cd w częściach nadziemnych. Jedynie opryskanie pędów glifosatem zwiększało wydajnie akumulację kadmu w częściach nadziemnych słonecznika. Była ona 3,6 razy większa od zawartości Cd w pędach roślin rosnących w glebie z EDTA i ponad 6-krotnie większa niż w roślinach kontrolnych (gleba bez EDTA).

Przedstawione wyniki wskazują, że wprowadzenie EDTA do gleby jest konieczne do uzyskania wysokiej akumulacji Pb w pędach obu gatunków roślin. Podanie EDTA zwiększa także w istotny sposób zawartość Cd w częściach nadziemnych. Gorczyca, która charakteryzowała się wyższą transpiracją, akumulowała więcej Pb i Cd w pędach, w porównaniu ze słonecznikiem. Opryskiwanie części nadziemnych gorczycy FC lub ABA w obecności w glebie wersenianu nie zmieniało zawartości Pb i Cd w pędach. Sugeruje to niewielkie znaczenie transpiracji w akumulacji ołowiu i kadmu w przypadku roślin rosnących w glebie.



Rys. 18. Wpływ opryskania pędów FC, KCl, ABA lub glifosatem (Glif) oraz podania EDTA do gleby na zawartość Cd w pędach słonecznika

K25 — 25 mM KCl; FC — 10^{-6} M fuzikokcyny. Przedstawione wyniki są średnimi \pm BS ($n = 6$). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się istotnie na podstawie testu NIR ($p \leq 0,05$)

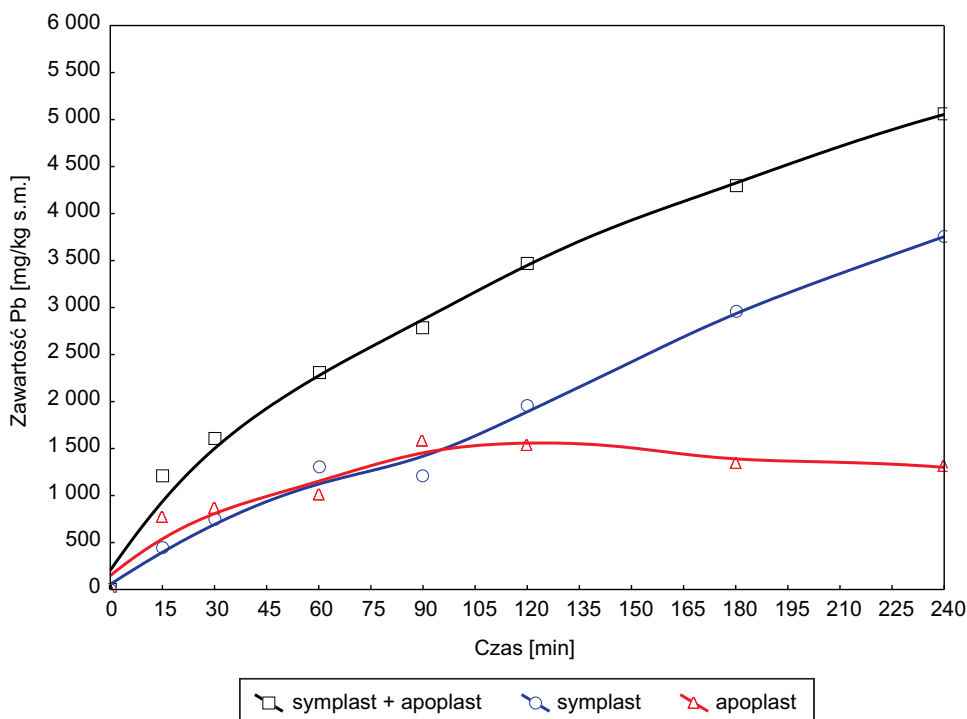
Bardzo wysoki poziom akumulacji Pb oraz Cd, po wprowadzeniu do gleby EDTA oraz opryskaniu pędów glifosatem, także wskazuje na małe znaczenie transpiracji w fitoekstrakcji indukowanej. Należy zaznaczyć, że równoczesne podanie obu związków znosiło różnice w poziomie akumulacji Pb i Cd w badanych gatunkach.

4.3. Wpływ Pb, EDTA i glifosatu na akumulację Pb, Ca i K w segmentach koleoptyli kukurydzy — badania na poziomie tkankowym

Badania wazonowe wykazały, że EDTA i glifosat silnie zwiększają zawartość Pb i Cd w pędach roślin. Aby określić, czy te związki chemiczne indukują pobieranie metali przez komórki roślinne (symplast), czy też odpowiadają za ich akumulację w przestworach i ścianach komórkowych (apoplast), przeprowadzono badania na segmentach koleoptyli kukurydzy. Segmenty koleoptyli są układem modelowym w badaniach fizjologicznych i ze względu na bardzo prostą budowę anatomiczną umożliwiają precyzyjną ocenę miejsca akumulacji pierwiastków — apoplast/symplast. Ponieważ akumulacja Pb i Cd, jak wynika z badań hydroponicznych i wazonowych, przebiegała w podobny sposób pod wpływem stosowanych związków chemicznych, badania na poziomie tkankowym przeprowadzono wyłącznie dla ołowiu. Aby odróżnić ilość metalu zakumulowanego w apoplaście od metalu zakumulowanego w symplacie, określono całkowitą zawartość Pb w segmentach oraz zawartość pierwiastka po desorpcji, czyli usunięciu metalu z apoplastu. Ostatecznie zawartość Pb po desorpcji traktowano jako ołów akumulowany w symplacie, a różnicę między jego całkowitą zawartością a zawartością po desorpcji — jako ołów akumulowany w apoplaście. W segmentach koleoptyli, oprócz Pb, oznaczono także zawartość Ca i K ze względu na różny sposób ich akumulacji w komórkach roślin. Wapń gromadzony jest zarówno w apoplaście, jak i w symplacie, natomiast potas akumulowany jest przede wszystkim w symplacie.

Badania na poziomie tkankowym rozpoczęto od określenia dynamiki akumulacji Pb w segmentach koleoptyli kukurydzy. Zawartość Pb w segmentach oznaczano po 15, 30, 60, 90, 120 i 240 minutach inkubacji w roztworze zawierającym 100 μM Pb. Badania wykazały (rys. 19), że przez pierwsze 90 minut poziom akumulacji Pb był podobny zarówno w apoplaście, jak i w symplacie. Przy wydłużeniu czasu inkubacji zawartość Pb w apoplaście utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie aż do 240. minuty, a zawartość metalu w symplacie systematycznie wzrastała. Świadczy to o tym, że począwszy od 90. minuty akumulacja Pb związana jest głównie z pobieraniem pierwiastka przez

symplast, a nie z odkładaniem w apoplastie, tym samym zależy od metabolizmu komórki. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, zdecydowano więc, że czas inkubacji wynoszący 240 minut jest wystarczający zarówno do oceny wpływu badanych związków chemicznych na akumulację Pb w symplacie, jak i apoplastie. Dlatego w dalszych badaniach oznaczano zawartość pierwiastków w segmentach koleoptyli wyłącznie po 240 minutach inkubacji.



Rys. 19. Dynamika akumulacji Pb w segmentach koleoptyli kukurydzy

W celu określenia stężenia Pb w symplacie desorbowano segmenty przez 30 minut w 1 mM Na₂EDTA o pH 4,5. Krzywe zamieszczone na wykresie zostały dopasowane metodą najmniejszych kwadratów

Wpływ EDTA oraz glifosatu na akumulację Pb oraz K i Ca w segmentach koleoptyli po 240 minutach inkubacji obrazują dane zawarte w tabeli 16. Całkowita zawartość Pb w segmentach inkubowanych w APW (kontrola) była niewielka i nie przekraczała 9,6 mg/kg. Ogromna większość pierwiastka (84%) znajdowała się w symplacie. Zawartość Ca w segmentach kontrolnych wynosiła 357,5 mg/kg, a jego ilość w symplacie i apoplastie była podobna i wynosiła odpowiednio 59% i 41%. Z kolei zawartość potasu w symplacie była bardzo wysoka (89%), w apoplastie zaś wynosiła zaledwie 11%.

Po inkubacji segmentów w obecności 100 μM Pb (APW + Pb) całkowita zawartość tego metalu wynosiła 5 056,5 mg/kg, z czego 74% stwierdzono w sym-

pląście, a 26% w apopląście (tabela 16). Zawartość Ca nie zmieniała się w istotny sposób, natomiast ołów wyraźnie wpłynął na akumulację K. Całkowita zawartość potasu w obecności Pb była o 27% mniejsza od zawartości K w segmentach kontrolnych. Należy podkreślić, że cały potas znajdował się w sympląście i jego zawartość była o 16% mniejsza od zawartości w kontroli. Przedstawione wyniki świadczą o tym, że Pb wprowadzony do roztworu w formie nieorganicznej jest pobierany przez komórki koleoptyli i akumulowany głównie w sympląście. Natomiast ołów zakumulowany w apopląście wypiera całkowicie z tego przedziału jednowartościowe jony K^+ , a nie wpływa istotnie na zawartość Ca. Należy zwrócić uwagę, że Pb obniża zawartość K w sympląście, co świadczy o jego toksycznym działaniu i wzroście przepuszczalności błon.

Tabela 16

Wpływ Pb oraz EDTA i glifosatu (Glif) na akumulację Pb, Ca i K [mg/kg s.m.] w segmentach koleoptyli kukurydzy po 240 minutach inkubacji

Wariant doświadczenia	Zawartość pierwiastka [mg/kg]					
	Pb		Ca		K	
	całkowita	symplast	całkowita	symplast	całkowita	symplast
APW (kontrola)	9,6	8,1	357,5	209,9	19 222	17 116
APW + Pb 100 μ M	5 056,5	3 752,2	382,2	255,3	14 057	14 362
APW + Pb 100 μ M + EDTA	15,4	7,23	119,4	59,6	17 854	15 509
APW + Pb 100 μ M + Glif	561,9	118,9	47,2	< 2,14	1 684	1 228

Dane są średnimi ($n = 3$). Błąd standardowy nie przekraczał 14%.

Dodanie do roztworu inkubacyjnego EDTA (APW + Pb + EDTA) drastycznie obniża akumulację Pb tak, że całkowita zawartość tego pierwiastka nie różni się istotnie od kontroli (tabela 16). Obecność wersenianu zmniejsza również akumulację Ca, którego całkowita zawartość stanowiła tylko 33% zawartości w segmentach z kontroli, natomiast związek chelatujący nie wpłynął istotnie na proporcję między wapniem zakumulowanym w apopląście i sympląście. W odróżnieniu od Pb i Ca, EDTA miał mniejszy wpływ na zawartość K w komórkach koleoptyli. Związek kompleksujący obniża całkowitą zawartość tego pierwiastka jedynie o 7%, przy czym zmniejszyła się tylko akumulacja K w sympląście, a nie w apopląście. Przedstawione rezultaty dowodzą, że kompleks PbEDTA nie jest w ogóle pobierany przez komórki segmentów koleoptyli, a także nie jest akumulowany w apopląście.

Wersenian wiąże także dużą część Ca znajdującą się w ścianach komórkowych, a ponadto ogranicza pobieranie tego pierwiastka przez komórki. Jednowartościowe jony potasu występujące w apopląście, w odróżnieniu od 2-wartościowych jonów Pb i Ca, nie były wiązane przez EDTA. Powstały kompleks PbEDTA wykazywał słabsze toksyczne działanie na błony komórkowe, czego

efektem była wyższa zawartość K w symplaście w porównaniu z segmentami z wariantu APW + Pb.

Obecność glifosatu w roztworze inkubacyjnym zdecydowanie zmniejszała akumulację Pb w koleoptylach w stosunku do segmentów z wariantu APW + Pb (tabela 16). W efekcie całkowita zawartość tego metalu w komórkach koleoptyli traktowanych herbicydem (562 mg/kg) stanowiła tylko 11% całkowitej zawartości w koleoptylach z wariantu APW + Pb. Zmienione zostały również proporcje między akumulacją Pb w symplaście a akumulacją tego metalu w apoplaście. Podczas gdy w segmentach z wariantu APW + Pb stężenie Pb w symplaście stanowiło 74%, w segmentach z wariantu z glifosatem wynosiło zaledwie 21%. Pod wpływem herbicydu i Pb bardzo silnie została zmodyfikowana akumulacja Ca. Zawartość tego pierwiastka w symplaście była poniżej 2,14 mg/kg s.m., a całkowita zawartość stanowiła zaledwie 13% zawartości Ca w segmentach inkubowanych tylko w obecności Pb. Glifosat powodował silny wzrost przepuszczalności błon i wypływ K z komórek segmentów. W efekcie zawartość tego pierwiastka w symplaście wynosiła 7,1% zawartości w kontroli. Również całkowita zawartość K została obniżona do 1 684 mg/kg s.m. (8,8% kontroli). Wpływ Glif na zawartość K oraz Ca wskazuje na silniejszy wpływ tego związku chemicznego na przepuszczalność błon w porównaniu z EDTA. Glifosat nie stymuluje pobierania Pb przez komórki segmentów, obniżając akumulację tego pierwiastka zarówno w symplaście (o 96%), jak i w apoplaście (o 66%) w porównaniu z segmentami inkubowanymi jedynie w obecności Pb.

5. Dyskusja

Jedną z metod fitoremediacji jest fitoekstrakcja indukowana, nad którą intensywne badania zostały zapoczątkowane w latach 90. ubiegłego wieku (Cunnin h g a m, O w, 1996; S a l t i w s p ó ł p r., 1998; N o w a c k i w s p ó ł p r., 2006). Większość dotychczas przeprowadzonych eksperymentów koncentrowała się na poszukiwaniu związku chelatującego najefektywniejszego w uruchamianiu metali w podłożu, jak również w stymulacji pobierania metali przez rośliny i ich akumulacji w pędach (S c h m i d t, 2003; L e š t a n i w s p ó ł p r., 2008; S a i f u l l a h i w s p ó ł p r., 2009). W przeciwieństwie do związków chelatujących, znacznie mniej uwagi poświęcono roślinom, w zasadzie ograniczając się do selekcji gatunków użytecznych w tym procesie. W konsekwencji nadal niewiele wiadomo na temat mechanizmów wywołujących zjawisko hyperakumulacji w roślinach niebędących hyperakumulatorami, jak również czynników decydujących o akumulacji Pb i Cd w pędach.

Wielu autorów uważa, że transpiracja jest najważniejszym czynnikiem decydującym o poziomie akumulacji metali w fitoekstrakcji indukowanej (B l a y - l o c k i w s p ó ł p r., 1997; S a l t i w s p ó ł p r., 1998; V a s s i l i w s p ó ł p r., 1998; G l e b a i w s p ó ł p r., 1999; A l k o r t a i w s p ó ł p r., 2004; N o w a c k i w s p ó ł p r., 2006; M e e r s i w s p ó ł p r., 2008; S a i f u l l a h i w s p ó ł p r., 2009). Jednak pogląd ten nie został do tej pory potwierdzony eksperymentalnie. Dotychczas głównie sprawdzano wpływ związków chelatujących na transpirację po dodaniu ich do zanieczyszczonej metalami gleby (V a s s i l i w s p ó ł p r., 1998; E p s t e i n i w s p ó ł p r., 1999; W u i w s p ó ł p r., 1999; W e n z e l i w s p ó ł p r., 2003; H e r n á n d e z - A l l i c a i w s p ó ł p r., 2007), natomiast nie określano wpływu modyfikacji transpiracji na poziom akumulacji metali w pędach.

5.1. Zależność między transpiracją a akumulacją Pb i Cd w pędach roślin z indukowaną hyperakumulacją metali

Zależności obserwowane w trakcie badań w kulturach hydroponicznych

Badania z gorzycą sarepską (*Brassica juncea* 'Phyto 426') przeprowadzone w kulturach hydroponicznych miały na celu określenie bezpośrednich zależności między transpiracją a poziomem akumulacji Pb i Cd w pędach po indukcji hyperakumulacji w roślinach. W celu modyfikacji transpiracji, po raz pierwszy w badaniach dotyczących fitoekstrakcji indukowanej, zastosowano regulator roślinny fuzikokcynę (FC). Charakterystyczną cechą jej działania jest silna stymulacja transpiracji, która nie zanika nawet w ciemności (Assman, Schwartz, 1992). W przeciwieństwie do innych regulatorów roślinnych stymulujących transpirację, jak: auksyny, gibereliny czy cytokininy, działanie FC na rośliny jest bardziej specyficzne i ograniczone głównie do transpiracji (Zeiger, 1983; Assman, Schwartz, 1992; Jankiewicz, 1997b). Ponieważ wpływ FC na otwieranie szparek jest zawsze związany z pobieraniem jonów K^+ przez komórki (Squire, Mansfield, 1974; Jankiewicz, 1997b), rośliny poddawano działaniu 10^{-6} M FC i różnych stężeń KCl (od 1 mM do 100 mM).

W roślinach kontrolnych uprawianych w pożywce podstawowej zmiany transpiracji miały typowy przebieg, z maksimum o godzinie 12¹⁵ i minimum o godzinie 22¹⁵ (rys. 3). Podobne zależności w przypadku gorzycy sarepskiej (*Brassica juncea* '426308') obserwowali Vassil i współpr. (1998). Opryskanie roślin mieszaniną 10^{-6} M FC i KCl w stężeniach powyżej 25 mM istotnie zwiększało transpirację. Należy podkreślić, że FC + KCl stymulowały transpirację także w godzinach nocnych pierwszej doby eksperymentu, czyli w czasie najniższej transpiracji, między godziną 18¹⁵ a 6¹⁵ następnego dnia (7—19 godzin eksperymentu). Efekt ten zanikał po 31 godzinach od momentu oprysku roślin (rys. 3).

Wprowadzenie EDTA, Pb, Cd oraz dodatkowo 25 μ M Zn do pożywki całkowicie zmieniło przebieg dobowych zmian transpiracji u gorzycy (rys. 4). Bardzo charakterystyczny był brak wzrostu transpiracji między godzinami 6¹⁵ a 12¹⁵ następnego dnia, czyli w 19. i 25. godzinie eksperymentu. Efekt hamowania transpiracji w gorzycy sarepskiej rosnącej w pożywce zawierającej Pb i EDTA obserwowali także Vassil i współpr. (1998). Ograniczenie transpiracji roślin stwierdzono również po dodaniu do pożywki metali ciężkich (bez EDTA). Haag-Kerwer i współpr. (1999) oraz Hsu i Kao (2003) opisali wyraźne hamowanie transpiracji w *Brassica juncea* i *Oryza sativa* pod wpływem Cd wprowadzonego do pożywki, Vassil i współpr. (1998) stwierdzili podobny wpływ Pb na transpirację *Brassica juncea*, a Woźny i współpr. (1995) wykazali zamykanie szparek *Hordeum vulgare* pod wpływem

ołowiu. Potwierdza to, że obserwowany w doświadczeniach hydroponicznych spadek poziomu transpiracji roślin rosnących w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn (rys. 4) wywołany był obecnością Pb, Cd oraz EDTA.

Opryskanie części nadziemnych gorczycy uprawianej w pożywce EDTA/Pb/Cd/Zn roztworami zawierającymi 10^{-6} M FC i KCl, w stężeniach powyżej 10 mM, powodowało istotny wzrost transpiracji (rys. 4 i 8). Wzrostowi transpiracji towarzyszył wyższy poziom akumulacji Pb i Cd w pędach gorczycy (rys. 10 i 12). W celu określenia zależności między transpiracją a zawartością Pb i Cd w pędach roślin obliczono współczynniki korelacji. Wartości współczynników nie przekraczały 0,50, jednak były dodatnie dla obu metali i w przypadku Cd istotne statystycznie (tabela 10). Należy podkreślić, że korelacje były wyższe, gdy porównywano zawartość metali z ilością wody wytranspirowanej po 19, 25, 31 i 35 godzinach od oprysku niż z całkowitą ilością wody wytranspirowanej po 49 godzinach. Świadczy to o tym, że o akumulacji Pb i Cd przede wszystkim decyduje poziom transpiracji w ciągu pierwszych 31 godzin od momentu indukcji hyperakumulacji. Taką zależność sugerowali już wcześniej Epstein i współpr. (1999). Badania innych autorów pokazały, że gorczyca sarepska akumuluje Pb i Cd głównie w korzeniach (Huang, Cunningham, 1996; Ghosh, Singh, 2005). Aby wykazać, czy wprowadzenie EDTA do pożywki doprowadziło do indukcji hyperakumulacji metali w gorczycy, oznaczono zawartość Pb i Cd w korzeniach roślin, których pędy opryskano 10^{-6} M FC z 25 mM KCl lub 50 mM KCl. W obu przypadkach stwierdzono niższą zawartość obu metali w korzeniach w porównaniu z częściami nadziemnymi, co wskazuje na indukcję hyperakumulacji. Wyniki te sugerują, że natężenie transpiracji jest istotnym czynnikiem decydującym o zawartości Pb i Cd w pędach roślin, w których indukowano hyperakumulację. Równocześnie największe znaczenie ma poziom transpiracji w ciągu pierwszych 20—35 godzin od opryskania roślin. Ponadto przedstawione rezultaty pokazują, że dzięki zastosowaniu oprysku FC + KCl zwiększa się transpiracja, która jest dodatnio skorelowana z poziomem akumulacji metali w pędach po indukcji hyperakumulacji. W konsekwencji możliwe wydaje się regulowanie efektywności indukowanej fitoekstrakcji Pb i Cd przez modyfikowanie procesu transpiracji.

W literaturze naukowej brak jest danych dotyczących zależności między transpiracją a poziomem akumulacji Pb i/lub Cd w częściach nadziemnych roślin po indukcji hyperakumulacji. Tylko nieliczni autorzy badali wpływ regulatorów roślinnych stymulujących wzrost i transpirację na pobieranie i akumulację w pędach kompleksów Pb i Cd ze związkami chelatującymi. Lopez i współpr. (2005, 2007b), prowadząc doświadczenia w kulturach hydroponicznych, stwierdzili istotnie wyższą zawartość Pb w liściach *Medicago sativa*, uprawianych w pożywce zawierającej EDTA + IAA, EDTA + kinetynę lub EDTA + IAA + kinetynę, w porównaniu z roślinami uprawianymi w pożywce

z EDTA. Jednak nie obserwowali oni akumulacji Pb w łodygach, co było prawdopodobnie spowodowane zbyt niskim stężeniem Pb i EDTA (200 μM), a w konsekwencji brakiem indukcji hyperakumulacji. Świadczy o tym wielokrotnie wyższa zawartość metalu w korzeniach *Medicago sativa* w porównaniu z łodygami i liśćmi. Wzrost zawartości Pb w częściach nadziemnych *Sesbania drummondii*, po wprowadzeniu auksyn (IAA lub NAA) do pożywki zawierającej 1 500 μM Pb oraz 300 μM EDTA, obserwowali Israr i Sahi (2008). Mimo wysokiego stężenia Pb w pożywce, zawartość tego pierwiastka w pędach, po podaniu EDTA, wynosiła tylko 600 mg/kg s.m., a maksymalna zawartość w roślinach z wariantu EDTA + 100 μM IAA — 2 037 mg Pb/kg s.m. Poziom akumulacji Pb był więc w tym przypadku znacznie niższy od obserwowanego w gorzycy sarepskiej traktowanej FC + KCl, gdzie stwierdzono 7 212 mg Pb/kg s.m. pędów, przy stężeniu Pb w pożywce 500 μM (rys. 10). W eksperymentach przeprowadzonych przez López i współpr. (2005, 2007b) oraz Israra i Sahiego (2008) określano wpływ fitohormonów na akumulację tylko jednego metalu (Pb). Natomiast w doświadczeniach prezentowanych w niniejszej monografii wykazano równoczesny wzrost akumulacji Pb i Cd po opryskaniu pędów FC + KCl, co świadczy o braku konkurencji w pobieraniu i transporcie badanych metali. Należy też podkreślić, że López i współpr. (2005, 2007b) oraz Israr i Sahi (2008) nie badali zmian transpiracji po zastosowaniu regulatorów chemicznych. Ponadto badane przez nich fitohormony (auksyny, gibereliny, cytokininy) nie tylko zwiększają natężenie transpiracji, ale także stymulują bardzo wiele różnych procesów, jak na przykład wzrost i pobieranie jonów 2-wartościowych (Darra, Saxena, 1973; Jankiewicz, 1997c; Legocka, 1997; Vodnik i współpr., 1999 i cytowana tam literatura; Dodd, 2003; David-Assael i współpr., 2006; Song i współpr., 2006). Przedstawione w niniejszej monografii wyniki są więc pierwszymi ukazującymi dynamikę zmian w poziomie transpiracji po zastosowaniu regulatorów roślinnych w ciągu 49 godzin, jak również dodatnią korelację między transpiracją modyfikowaną opryskiem FC + KCl a poziomem akumulacji Pb i Cd w pędach gorzycy sarepskiej. Należy jednak zaznaczyć, że obliczone współczynniki korelacji były niskie i istotne statystycznie tylko w przypadku Cd.

Badania w kulturach hydroponicznych wykazały także dodatni wpływ opryskania pędów gorzycy tylko KCl na poziom akumulacji Pb i Cd w częściach nadziemnych. Zastosowanie oprysku z KCl zwiększyło zawartość obu pierwiastków w pędach (rys. 9 i 11), chociaż efekt ten był o wiele słabszy w porównaniu z działaniem FC + KCl (rys. 10 i 12). W przypadku Pb widać było wyraźną tendencję wzrostową w akumulacji tego metalu wraz ze wzrostem stężenia soli potasowej, jednak obserwowane różnice nie były istotne statystycznie (rys. 9). Natomiast zawartość Cd po opryskaniu części nadziemnych 50 mM KCl lub 100 mM KCl była istotnie większa (rys. 11). Równocześnie

traktowanie pędów KCl nie wpływało na dynamikę zmian transpiracji (rys. 4), ani nie zwiększało istotnie całkowitej ilości wytranspirowanej wody po 49 godzinach eksperymentu (rys. 7). Wyniki te sugerowały, że sól potasowa stymuluje akumulację obu metali w sposób niezależny od transpiracji. Aby to sprawdzić, określono korelacje między tymi parametrami. Obliczone współczynniki korelacji między ilością wytranspirowanej wody po 19, 25, 31 i 35 godzinach a zawartością Pb i Cd w pędach roślin opryskanych KCl były ujemne i nieistotne statystycznie (tabela 9). Dodatnią korelację dla obu metali, ale także nieistotną statystycznie, stwierdzono tylko dla całkowitej ilości wytranspirowanej wody (po 49 godzinach). Sugeruje to, że po opryskaniu pędów KCl akumulacja Pb i Cd w częściach nadziemnych tylko w niewielkim stopniu zależy od transpiracji. W związku z tym obliczono współczynniki korelacji między stężeniem KCl użytego do oprysku a zawartością Pb i Cd w pędach gorczycy. W przypadku roślin traktowanych tylko KCl korelacje dla obu metali były dodatnie (tabela 11). Należy podkreślić, że dla Cd wartość współczynnika była wysoka (0,78), a korelacja istotna statystycznie. W przypadku roślin opryskanych FC + KCl korelacje dla obu metali były także dodatnie, istotne statystycznie, a wartości współczynników wysokie (0,67—0,72) (tabela 12). Chlorek potasu musi więc stymulować akumulację obu metali w częściach nadziemnych przez modyfikację innych procesów niż transpiracja. Taką zależność wyraźnie potwierdzają wyniki dotyczące zawartości Pb i Cd po traktowaniu pędów 10^{-6} M FC i KCl. Zarówno w przypadku Pb (rys. 10), jak i Cd (rys. 12) obserwowano wzrost zawartości wymienionych metali w częściach nadziemnych wraz ze wzrostem stężenia KCl użytego do oprysku z 10^{-6} M FC. Należy zwrócić uwagę, że zastosowanie 10^{-6} M FC z 1 mM KCl lub 5 mM KCl tylko w niewielkim stopniu wpłynęło na zawartości Pb i Cd w stosunku do roślin opryskanych wodą dejonizowaną. Wyniki te sugerują, że traktowanie fuzikokcyną stymuluje transpirację, ale nie zwiększa w istotny sposób zawartości obu metali w częściach nadziemnych. Dopiero zastosowanie FC i KCl w stężeniach wyższych niż 10 mM powoduje wyraźny wzrost akumulacji Pb i Cd (rys. 10 i 12), co świadczy o synergistycznym działaniu obu związków chemicznych. W literaturze brak jest danych na temat wpływu jonów K^+ na zawartość Pb i Cd w roślinach po indukcji hyperakumulacji.

Najbardziej prawdopodobnym sposobem działania KCl, zwiększającego akumulację PbEDTA i CdEDTA w pędach, jest jego oddziaływanie na przewodnictwo hydrauliczne korzenia i ksylemu. Równocześnie sugeruje to, że transport wymienionych kompleksów zachodzi głównie apoplastem. Różni autorzy obserwowali wzrost przewodnictwa hydraulicznego korzenia i ksylemu pod wpływem KCl w stężeniach od 0,1 mM do 100 mM (Van Ieperen i współpr., 2000; Zwieniecki i współpr., 2001). Zwieniecki i współpr. (2001) postawili hipotezę, że ten wzrost przewodnictwa związany jest

z ograniczaniem pęcznienia pektyn pod wpływem KCl, w efekcie czego wzrasta średnica mikrokapilar w obrębie ścian komórkowych. Najnowsze badania potwierdzają wzrost przewodnictwa hydraulicznego ksylemu pod wpływem KCl, wykazując równocześnie duże różnice międzygatunkowe oraz sezonowe w reakcji na sól potasową (Gascó i współpr., 2007).

W celu sprawdzenia, czy po indukcji hyperakumulacji w roślinach akumulacja Pb i Cd zachodzi w podobny sposób, jak akumulacja pierwiastków o funkcjach fizjologicznych, w pędach oznaczono także zawartość K, Ca i Zn (tabela 5–8). O wyborze tych pierwiastków zdecydowały odmienne drogi ich przemieszczania się w tkankach oraz różnice w mechanizmach pobierania przez komórki roślin (Marschner, 1995; White, 2001; Antosiewicz, 2005; Krämer i współpr., 2007; Verkleij i współpr., 2009). Większość autorów uważa, że pobieranie i transport chelatów PbEDTA i CdEDTA odbywa się w poprzek korzenia oraz przez endodermę wyłącznie przestworami i ścianami komórkowymi, z pominięciem symplastu (Collins i współpr., 2001; Nowack i współpr., 2006; Schaidler i współpr., 2006; Leštan i współpr., 2008). Ponieważ wapń jest transportowany do walca osiowego i ksylemu głównie apoplastem (White, 2001), tworzy chelaty z EDTA (Collins i współpr., 2001), a jego akumulacja w pędach w dużym stopniu zależy od transpiracji (Marschner, 1995), zakładano podobne zależności między transpiracją a akumulacją Ca w pędach gorczycy po indukcji hyperakumulacji, jak w przypadku PbEDTA i CdEDTA. Tymczasem po opryskaniu pędów gorczycy KCl lub FC + KCl stwierdzono brak korelacji między transpiracją a akumulacją Ca lub też obliczone współczynniki korelacji były ujemne i dla 35., i 49. godziny eksperymentu istotne statystycznie (tabela 9 i 10). Rezultaty te sugerują, że w odróżnieniu od Pb i Cd, akumulacja wapnia w częściach nadziemnych roślin z indukowaną hyperakumulacją jest niezależna od transpiracji. Jednak ujemna i istotna statystycznie korelacja między akumulacją Ca a stężeniem KCl zastosowanym do oprysku (tabela 11) dowodzi, że o zawartości Ca w pędach decyduje przede wszystkim antagonizm między jonami K^+ i Ca^{2+} . Antagonistyczne oddziaływanie między jonami K^+ a Ca^{2+} lub K^+ a Mg^{2+} jest powszechnie znane (Stark, 2002).

Potas jest pierwiastkiem, który pobierany jest przez komórki korzenia i transportowany przede wszystkim symplastem, a natężenie transpiracji ma niewielki wpływ na zawartość K w częściach nadziemnych roślin (Marschner, 1995). Obliczone współczynniki korelacji między ilością wytranspirowanej wody a zawartością K w pędach gorczycy po oprysku KCl lub FC + KCl (tabela 9 i 10) były nieistotne statystycznie, co wskazuje na brak zależności między tymi parametrami także w przypadku roślin z indukowaną hyperakumulacją. Natomiast wysoką i dodatnią korelację zaobserwowano między stężeniem KCl użytym do oprysku a zawartością tego pierwiastka w częściach nadziemnych, co niewątpliwie było związane z samym opryskiem solą potasową.

Brak wyraźnych zależności między transpiracją a akumulacją oraz między stężeniem KCl zastosowanego do oprysku a akumulacją stwierdzono w przypadku Zn (tabela 9—12).

Omówione wyniki pozwalają twierdzić, że po indukcji hyperakumulacji w gorzycy pobieranie przez korzenie i akumulacja Pb i Cd w pędach zachodzą w podobny sposób. Nie zaobserwowano także konkurencji między tymi metalami. Natomiast mechanizm pobierania i transportu pierwiastków o funkcjach fizjologicznych (K, Ca, Zn) jest inny, a w przypadku K i Ca potwierdzono oddziaływanie antagonistyczne.

Zależności obserwowane w trakcie doświadczeń wazonowych

Kultury hydroponiczne są układem modelowym, w którym system korzeniowy roślin ma stały dostęp do wody, soli mineralnych, tlenu oraz nie napotyka mechanicznych przeszkód ograniczających jego wzrost. Natomiast w trakcie uprawy roślin w substracie glebowym korzenie mają kontakt z różnymi czynnikami, jak zbita gleba, nierównomierne rozmieszczenie makro- i mikroelementów, niedobory tlenu lub inne czynniki stresowe. Ponadto obecność w glebie bakterii i grzybów, w tym grzybów mikoryzowych, może zwiększać lub zmniejszać pobieranie składników mineralnych (Chen i współpr., 2004a; Jurkiewicz i współpr., 2004; Di Gregorio i współpr., 2006; Gucwa-Przepióra i współpr., 2007).

Badania wykazały, że zbite podłoże powoduje hamowanie wzrostu korzeni, zgrubienia ścian komórkowych ryzodermi i endodermi (Degenhardt, Gimmler, 2000), a także syntezę ABA, co prowadzi do zamykania szparek i ograniczenia wzrostu pędów (Roberts i współpr., 2002). Niedobory wody, tlenu, zasolenie oraz obecność metali toksycznych (np. Cd) w glebie przyspieszają powstawanie pasemek Caspary'ego i lameli suberynowej w egzo- i endodermie (Schreiber i współpr., 1999; Zimmermann i współpr., 2000; Enston i współpr., 2003; Karahara i współpr., 2004; Enston, Peterson, 2005). Opisane zmiany w korzeniach, zachodzące w czasie wzrostu w substracie glebowym, obniżają ich przepuszczalność dla wody, jonów i związków chemicznych (Schreiber i współpr., 1999; Enston i współpr., 2003). Dlatego w przypadku badań nad fitoekstrakcją indukowaną wyniki doświadczeń w kulturach hydroponicznych powinny być weryfikowane przez eksperymenty wazonowe.

Doświadczenia wazonowe przeprowadzono z dwoma gatunkami roślin — gorzycą sarepską (*Brassica juncea* 'Phyto 426') oraz słonecznikiem (*Helianthus annuus* 'Lech'). Drugi gatunek rośliny włączono do badań z dwóch powodów. Fitoremediacja jest procesem długotrwałym, w związku z tym w czasie jej trwania konieczne jest stosowanie płodozmianu. Chodziło również o sprawdzenie, czy zaobserwowane w trakcie doświadczeń hydroponicznych zależności są

typowe tylko dla gorczycy sarepskiej, czy też są bardziej uniwersalne, co będzie wskazówką do uogólnień uzyskanych wyników.

Gorzycyca rosnąca w glebie zanieczyszczonej Pb i Cd reagowała zwiększoną transpiracją w odpowiedzi na oprysk 10^{-6} M FC (tabela 14). Jednak podobnie jak w kulturach hydroponicznych, efekt ten był krótkotrwały i po 48 godzinach nie obserwowano już istotnych różnic w transpiracji. W przeciwieństwie do badań hydroponicznych, dodanie 25 mM KCl do 10^{-6} M FC nie skutkowało dalszym zwiększaniem transpiracji. Wyniki te wskazują, że FC jest stymulatorem transpiracji w przypadku gorczycy rosnącej w zanieczyszczonej metalami glebie, jednak FC i KCl nie wykazują synergistycznego działania, jak to obserwowano w hydroponikach. Równocześnie zawartość Pb i Cd w pędach była niewielka i nie różniła się istotnie, niezależnie od wariantu (rys. 15 i 17). W przypadku słonecznika, w odróżnieniu od gorczycy, nie obserwowano żadnych istotnych zmian w transpiracji (tabela 15), jak również w zawartości obu metali (rys. 16 i 18) w częściach nadziemnych, niezależnie od składu oprysku. Wyniki te dowodzą, że modyfikacja transpiracji, bez podania związku kompleksującego do gleby, nie wpływa na akumulację Pb i Cd w pędach gorczycy i słonecznika.

EDTA zaaplikowany do gleby nie hamował transpiracji w gorczycy sarepskiej w ciągu pierwszych 5 dni, a w 6. i 7. dniu obserwowano istotny wzrost tego procesu w stosunku do kontroli (tabela 14). Dotychczas opublikowano tylko dwie prace przedstawiające dynamikę zmian ilości wytranspirowanej wody po podaniu EDTA do gleby. Epstein i współpr. (1999) w *B. juncea*, uprawianej w glebie zawierającej 600 mg Pb/kg, stwierdzili brak zmian w poziomie transpiracji w stosunku do kontroli w ciągu 7 dni od wprowadzenia 5 mmoli EDTA/kg gleby. Tymczasem Wu i współpr. (1999) obserwowali istotny wzrost transpiracji w *Zea mays*, uprawianej również w glebie zanieczyszczonej Pb, począwszy od 1. aż do 7. dnia od wprowadzenia EDTA do gleby. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy pokazały, że także w gorczycy sarepskiej EDTA podany do zanieczyszczonej gleby może powodować wzrost transpiracji (tabela 14). Badania przeprowadzone przez Saifullah i współpr. (2010) mogą wyjaśniać różnice w reakcji gorczycy sarepskiej na takie same ilości EDTA podane do gleby (tabela 14, Epstein i współpr., 1999). Autorzy ci zaobserwowali, w zależności od rodzaju gleby, zarówno wzrost, jak i spadek transpiracji w *Triticum aestivum* po podaniu EDTA w ilości 8 mmoli/kg gleby. Pomiaru intensywności transpiracji dokonali jednokrotnie, po 10 dniach od wprowadzenia EDTA, nie określali więc dynamiki zmian tego procesu w czasie.

W przypadku słonecznika nie obserwowano żadnych różnic w transpiracji po podaniu związku kompleksującego do gleby (tabela 15). Do tej pory nie badano dynamiki zmian transpiracji w słoneczniku po indukcji hyperakumulacji. Jedynie Tassi i współpr. (2008) mierzyli natężenie transpiracji w słoneczniku po 7 dniach od wprowadzenia EDTA w ilości 2 mmoli/kg gleby. Autorzy ci

nie stwierdzili również żadnych różnic między intensywnością tego procesu w roślinach kontrolnych i uprawianych w glebie z dodatkiem związku chelatującego.

Wprowadzenie 5 mmoli EDTA/kg gleby istotnie zwiększało zawartość Pb i Cd w częściach nadziemnych gorczycy sarepskiej w stosunku do kontroli (rys. 15 i 17). Wielokrotny wzrost zawartości Pb i/lub Cd w pędach gorczycy sarepskiej, po dodaniu EDTA w ilości od 2 mmoli/kg do 10 mmoli/kg do zanieczyszczonej metalami gleby, podawany był przez różnych autorów (Epstein i współprac., 1999; Walker i współprac., 2003; Chen i współprac., 2004b; Ciu i współprac., 2004; Di Gregorio i współprac., 2006; Nascimento i współprac., 2006). W przypadku słonecznika obserwowano również wyższy poziom akumulacji Pb i Cd w stosunku do kontroli po zastosowaniu 5 mmoli EDTA/kg gleby (rys. 16 i 18). Inni autorzy także stwierdzili istotny wzrost zawartości Pb (Meers i współprac., 2005; Tassi i współprac., 2008) i Cd (Chen, Cutright, 2001) w częściach nadziemnych słonecznika po wprowadzeniu do gleby wersenianu.

Opryskanie części nadziemnych 10^{-6} M FC, po dodaniu EDTA do gleby, powodowało niewielki wzrost transpiracji, podczas gdy opryskanie pędów ABA obniżało istotnie transpirację w ciągu pierwszych 48 godzin od traktowania roślin (tabela 14). Zabiegi te powinny odpowiednio zwiększyć lub zmniejszyć zawartość Pb i Cd w pędach gorczycy. Tymczasem nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie akumulacji obu metali w stosunku do roślin z wariantu EDTA (rys. 15 i 17). Świadczy to o tym, że w odróżnieniu od badań w kulturach hydroponicznych przejściowe zmiany w poziomie transpiracji w pierwszych 48 godzinach od oprysku nie mają istotnego wpływu na zawartość Pb i Cd w pędach gorczycy uprawianej w zanieczyszczonej metalami glebie. Nie potwierdzono także synergistycznego działania FC i KCl na transpirację, a w efekcie na akumulację Pb i Cd (rys. 15 i 17).

W przypadku słonecznika nie obserwowano wyraźnych zmian w transpiracji oraz zawartości Cd i Pb w pędach roślin pod wpływem oprysku regulatorami roślinnymi lub KCl po podaniu EDTA do gleby (tabela 15, rys. 16 i 18). Wyjątek stanowi istotny statystycznie wzrost akumulacji Pb (o 25%) w częściach nadziemnych słonecznika opryskanego 25 mM KCl w stosunku do roślin z wariantu EDTA (rys. 16). Należy podkreślić, że rośliny z tych wariantów nie różniły się zarówno zmianami poziomu transpiracji w ciągu 7 dni eksperymentu (tabela 15), jak i całkowitą ilością wytranspirowanej wody (rys. 14). Stymulujący wpływ oprysku KCl na zawartość Pb i Cd w pędach, niezależny od transpiracji, stwierdzono także w badaniach hydroponicznych z gorczycą sarepską, o czym świadczyły dodatnie i wysokie współczynniki korelacji między tymi parametrami (tabela 11 i 12).

Zaprezentowane tu rezultaty, dotyczące zarówno gorczycy sarepskiej, jak i słonecznika, wskazują na niewielkie znaczenie transpiracji w akumulacji Pb

i Cd w roślinach uprawianych w substracie glebowym. Również inni autorzy uzyskali wyniki sugerujące brak bezpośredniej zależności między tymi procesami. Epstein i współpr. (1999), po wprowadzeniu wersenianu w ilości 5 mmoli/kg do gleby zanieczyszczonej Pb, nie wykazali zmian w transpiracji w stosunku do kontroli, podczas gdy po podaniu 10 mmoli EDTA/kg gleby zaobserwowali 20% hamowanie już po 24 godzinach i niemal 80% hamowanie transpiracji po 7 dniach. Tymczasem zawartość Pb w pędach roślin rosnących w glebie z 5 mmoli EDTA wyniosła 435 mg/kg s.m., natomiast w pędach roślin rosnących w glebie z 10 mmoli EDTA wyniosła 1 930 mg/kg, mimo silnego hamowania transpiracji przez wyższą dawkę związku kompleksującego. Z kolei Tassiri i współpr. (2008) oznaczali zależność między natężeniem transpiracji a akumulacją Pb i Zn w pędach słonecznika (*H. annuus* 'Paola') po opryskaniu części nadziemnych mieszaninami różnych fitohormonów (Cytokinin i Phytagro) i podaniu EDTA do podłoża. Obserwowali oni istotny wzrost intensywności transpiracji po zastosowaniu Cytokininu i Phytagro wraz z EDTA w stosunku do roślin, które poddano tylko działaniu EDTA. Jednak tej intensywniejszej transpiracji nie towarzyszył wzrost zawartości Pb w pędach. Badania przeprowadzone przez Tassiri i współpr. (2008) nie wykazały więc bezpośredniej zależności między transpiracją a zawartością Pb w częściach nadziemnych słonecznika. Wyniki te zatem potwierdzają niewielki wpływ natężenia transpiracji na poziom akumulacji Pb w częściach nadziemnych roślin uprawianych w zanieczyszczonej glebie z dodatkiem EDTA. Wydaje się także bardzo prawdopodobne, że obserwowany przez innych autorów wzrost zawartości Pb w pędach, pod wpływem traktowania roślin IAA, NAA, kinetyną lub GA₃ (Lopez i współpr., 2005; Lopez i współpr., 2007b; Israr, Sahi, 2008; Lopez i współpr., 2009; Hadi i współpr., 2010), nie zależał od transpiracji, ale związany był ze stymulacją wzrostu, pobierania jonów 2-wartościowych lub zwiększeniem przewodnictwa korzeni i endodermy pod wpływem fitohormonów.

W niniejszej pracy, dla wzmocnienia indukcyjnego działania EDTA, stosowano oprysk glifosatem. Glifosat (N-(fosfonometyl)glicyna) jest herbicydem, który podany w formie oprysku pędów pobierany jest przez komórki, transportowany do floemu, a stąd floemem zarówno do wyżej położonych części pędu, jak również do kłaczy i korzeni (Sprankle i współpr., 1975; Fernandez, Bayer, 1977; Schultz, Burnside, 1980; Coupland, 1983; Reddy, 2000). W korzeniach wywołuje negatywne zmiany w metabolizmie, prowadzące do zmniejszonego pobierania wody, w efekcie czego dochodzi do hamowania transpiracji i wzrostu rośliny (Fuchs i współpr., 2002). Postawiono więc hipotezę, że po opryskaniu roślin glifosat (Glif) będzie transportowany do korzeni, gdzie działając na komórki endodermy, zwiększy indukcyjne działanie związku chelatującego i jego kompleksów z metalami. W związku z tym, że Glif hamuje transpirację, co wykazało wielu badaczy (Shaner,

1978; Brecke, Duke, 1980; Jachetta i współprac., 1986; Muñoz-Rueda i współprac., 1986; Fuchs i współprac., 2002) oraz pilotażowe doświadczenia autora pracy (por. rozdz. 3.1.3.3), w roślinach z tego wariantu nie mierzono transpiracji.

Traktowanie części nadziemnych glifosatem, po wprowadzeniu 5 mmoli EDTA/kg gleby, skutkowało znacznym wzrostem zawartości Pb i Cd w pędach obu gatunków roślin w stosunku do roślin z wariantu EDTA (rys. 15—18). Wyniki te dowodzą, że glifosat silnie zwiększa indukujące właściwości związku chelatującego i jego kompleksów z metalami. Należy podkreślić, że w roślinach z wariantu EDTA zawartość Pb w przypadku słonecznika wynosiła 81 mg/kg s.m., a dla gorczycy — 155 mg/kg s.m., wskazując na duże różnice między badanymi gatunkami w akumulacji ołowiu. Tymczasem zawartość Pb w pędach gorczycy sarepskiej i słonecznika traktowanych Glif była prawie jednakowa i wynosiła odpowiednio 373 mg/kg s.m. i 358 mg/kg s.m. (rys. 15 i 16). Takie same zależności stwierdzono w przypadku Cd (rys. 17 i 18). Oprysk glifosatem wywołał podobny efekt akumulacji niezależnie od gatunku rośliny. Biorąc pod uwagę silne hamowanie transpiracji przez Glif, przedstawione rezultaty wskazują na niewielki wpływ tego procesu na akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych gorczycy i słonecznika.

Dotychczas opublikowano niewiele prac dotyczących działania Glif na akumulację metali w fitoekstrakcji indukowanej, a otrzymane rezultaty nie są jednoznaczne. Kayser i współprac. (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 współprac. (2001, cyt. za: Schmidt, 2003) oraz Wilde i współprac. (2005) nie obserwowali zwiększonej zawartości Cd lub Pb po zastosowaniu EDTA i glifosatu w porównaniu z wariantami, w których podano wyłącznie EDTA. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki pokazują, że oprysk glifosatem istotnie zwiększa indukcyjne właściwości EDTA zarówno w przypadku gorczycy sarepskiej, jak i słonecznika.

Obserwowany w trakcie doświadczeń wazonowych wysoki poziom akumulacji Pb i Cd w pędach może być związany z pobieraniem metali przez komórki i transportem symplastycznym lub ograniczeniem tylko do transportu i akumulacji w apoplacie. W literaturze jednak brak danych na temat wpływu Glif bądź EDTA na pobieranie Pb lub Cd przez komórki roślinne. W związku z tym przeprowadzono doświadczenia na poziomie tkankowym z segmentami koleoptyli kukurydzy. Segmenty koleoptyli są układem modelowym w badaniach fizjologicznych. Ze względu na bardzo prostą budowę anatomiczną umożliwiają łatwe rozdzielenie pobranych przez tkankę metali na zakumulowane w apoplacie lub symplacie. Doświadczenia na segmentach prowadzono tylko z Pb. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły stwierdzić, że kompleks PbEDTA,

w odróżnieniu od nieorganicznych form Pb, nie jest w ogóle pobierany przez komórki segmentów (tabela 16). Równocześnie EDTA i jego kompleksy z metalami zwiększają w niewielkim stopniu przepuszczalność błon, o czym świadczy spadek zawartości K w symplacie komórek segmentów koleoptyli. Sugeruje to, że PbEDTA jest transportowany w poprzek korzenia drogą apoplastyczną, aż do ksylemu włącznie. Tak więc kompleks ten musi mieć zdolność przemieszczania się przez ściany komórkowe i pasemka Caspary'ego endodermy. Ze względu na wzrost przepuszczalności błon, w wyniku działania kwasu wersenowego i jego kompleksów z metalami, możliwy jest również transport PbEDTA przez endodermę drogą symplastyczną.

Glifosat silnie hamuje pobieranie Pb przez komórki segmentów, jak również ogranicza akumulację tego metalu w apoplastyce (tabela 16). Równocześnie Glif drastycznie zwiększa przepuszczalność błon, czego efektem był spadek zawartości K w symplacie segmentów o 93% w stosunku do kontroli. Sugeruje to, że obserwowany wzrost zawartości Pb w pędach w trakcie doświadczeń wazonowych nie był związany ze stymulacją pobierania tego metalu przez komórki. Natomiast silny wzrost przepuszczalności błon pod wpływem Glif wyjaśnia zwiększenie indukcyjnego działania EDTA. Można postawić hipotezę, że w wyniku działania Glif na komórki endodermy możliwy jest transport kompleksów PbEDTA zarówno drogą apoplastyczną, jak i symplastyczną. Prawdopodobnie podobny efekt zwiększenia przewodnictwa korzenia i endodermy uzyskali inni autorzy, poddając korzenie działaniu silnych czynników stresowych. Lu o i współpr. (2006b) traktowali system korzeniowy *Brassica juncea* mieszaniną metanolu i trichlorometanu lub 0,1 M HCl przed podaniem EDTA i uzyskiwali znaczny wzrost akumulacji Pb w pędach. Z kolei Lu o i współpr. (2006d, 2007) oraz Chen i współpr. (2007), działając na korzenie związkami chelatującymi o wysokiej temperaturze (90–95°C), również obserwowali znaczny wzrost zawartości Pb i Cd w pędach różnych gatunków roślin. Zastosowanie tych czynników w warunkach polowych, w porównaniu z glifosatem, wydaje się jednak mało prawdopodobne.

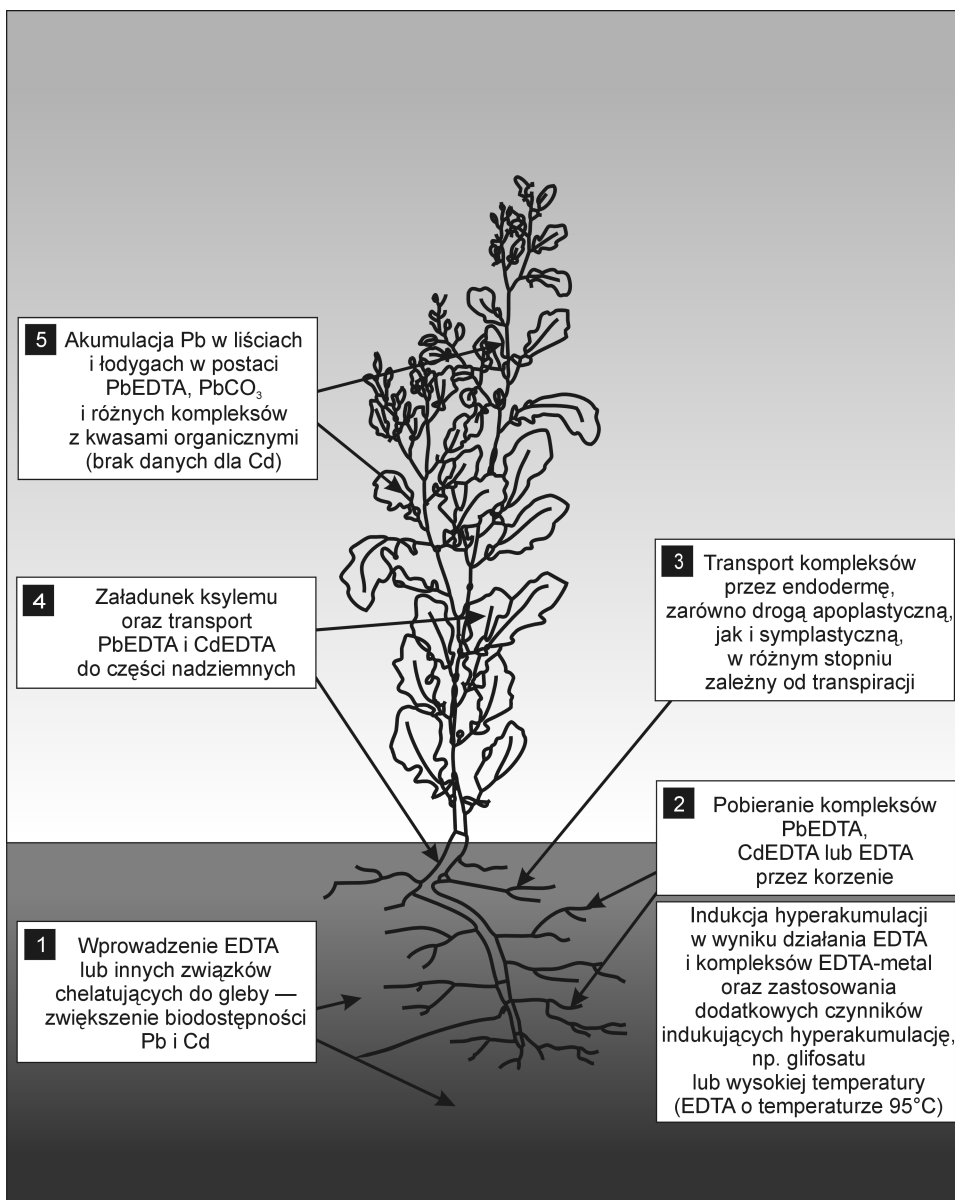
Procesy zachodzące w trakcie indukcji hyperakumulacji w roślinach

Podsumowując przedstawione wcześniej dane dotyczące badań wazonowych, można założyć, że w fitoekstrakcji indukowanej najważniejszym czynnikiem decydującym o poziomie akumulacji Pb i Cd w pędach nie jest intensywność transpiracji, ale stopień indukcji hyperakumulacji w roślinach. Bardzo wysoki stopień indukcji obserwowano w niniejszej pracy po podaniu EDTA do gleby i opryskaniu roślin glifosatem. W efekcie stwierdzono wysoką zawartość Pb i Cd w pędach zarówno gorczyicy sarepskiej, jak i słonecznika, mimo silnego hamowania transpiracji przez Glif. Należy podkreślić, że w roślinach z wariantu EDTA + Glif nie obserwowano różnic między poziomem akumulacji Pb

i Cd w obu gatunkach. Wszystko wskazuje na to, że wysoki poziom indukcji był efektem działania z jednej strony EDTA i jego kompleksów z metalami, a z drugiej — glifosatu na przewodnictwo endodermy. Wyniki doświadczeń z segmentami koleoptyli udowodniły silny wzrost przepuszczalności błon pod wpływem glifosatu. W związku z tym zakłada się, że Glif pobrany przez komórki pędów transportowany jest do korzeni, gdzie zwiększa przepuszczalność błon komórek endodermy, potęgując działanie związku chelatującego i jego kompleksów z metalami. W przypadku wysokiego poziomu indukcji natężenie transpiracji ma niewielki wpływ na pobieranie i transport w poprzek korzenia PbEDTA lub CdEDTA, które pokonują endodermę zarówno drogą apoplastyczną, jak i symplastyczną. Oczywiście, nie neguje to znaczenia prądu transpiracyjnego w transporcie tych kompleksów w samym ksylemie. Wszystko wskazuje na to, że wystarczy wtedy minimalny prąd transpiracyjny, aby uzyskać wysoki poziom akumulacji Pb i Cd w pędach. W takich warunkach zawartość Pb i/lub Cd w pędach będzie co najmniej równa lub znacznie większa niż w korzeniach, a traktowanie części nadziemnych związkami modyfikującymi transpirację nie będzie w sposób istotny wpływało na zawartość metali.

Niskiemu poziomowi indukcji będzie również towarzyszył wzrost zawartości Pb i/lub Cd w częściach nadziemnych, jednak akumulacja obu metali w korzeniach będzie o wiele wyższa w porównaniu z ich akumulacją w pędach. Transport kompleksów PbEDTA i CdEDTA przez endodermę będzie się odbywał prawie wyłącznie apoplastem, chociaż nie można wykluczyć niewielkiej roli transportu symplastycznego. W takich warunkach natężenie transpiracji może odgrywać bardzo dużą rolę w transporcie chelatów do walca osiowego. Możliwe jest także modyfikowanie transportu PbEDTA i CdEDTA do ksylemu, między innymi w efekcie traktowania roślin fitohormonami. W przypadku braku indukcji akumulacja Pb i/lub Cd w pędach po podaniu związku kompleksującego może być mniejsza niż w jego braku. Taki efekt dla Cd obserwowali niektórzy autorzy (Greger, Lindberg, 1986; Wójcik, Tukendorf, 1999; Sun i wspóln., 2005). Należy podkreślić, że występują duże różnice w podatności poszczególnych gatunków, a nawet kultywarów na indukcję hyperakumulacji. W przypadku gorczycy sarepskiej 'Phyto 426' obserwowano wysoką indukcję hyperakumulacji po wprowadzeniu do pożywki 0,5 mM Pb i 0,75 mM EDTA, natomiast Piechala i wspóln. (2003) stwierdzili niski poziom indukcji w *Pisum sativum* po podaniu 1,0 mM Pb i EDTA. Z kolei Xu i wspóln. (2007) obserwowali niższą akumulację Pb w pędach *Sorghum bicolor*, uprawianego w pożywce z 1,0 mM Pb i EDTA, w porównaniu z pożywką z nieorganiczną formą Pb.

Ostatecznie można zaproponować następujący przebieg procesów zachodzących w trakcie indukcji hyperakumulacji Pb i Cd w roślinach pod wpływem EDTA (rys. 20):



Rys. 20. Procesy zachodzące w trakcie indukcji hyperakumulacji metali w roślinach (Etap III z rys. 2)

1. Do gleby, w celu zwiększenia biodostępności metali, przede wszystkim Pb, wprowadza się związek chelatujący (EDTA). Powstałe kompleksy PbEDTA i CdEDTA, jako łatwo rozpuszczalne, przemieszczają się w kierunku korzeni na zasadzie dyfuzji i/lub przepływu masowego.

2. Kompleksy są pobierane przez korzenie, gdzie razem z EDTA indukują hiperakumulację. Poziom indukcji zależy od stężenia związku chelatującego i jego kompleksów z metalami w korzeniu. Dodatkowymi czynnikami zwiększającymi indukcję może być traktowanie części nadziemnych glifosatem lub działanie na korzenie wysoką temperaturą (EDTA o temperaturze 90—95°C).
3. Niski poziom indukcji związany jest z małym wzrostem przepuszczalności komórek endodermy, w związku z czym PbEDTA i CdEDTA przenikają przez śródskórną prawie wyłącznie drogą apoplastyczną. Transport ten może być w dużym stopniu zależny od natężenia transpiracji i modyfikowany przez regulatory roślinne. Wysoki poziom indukcji związany jest ze znacznym wzrostem przepuszczalności błon komórek endodermy, wówczas transport PbEDTA i CdEDTA zachodzi zarówno drogą apoplastyczną, jak i symplastyczną. W tym przypadku intensywność transpiracji ma niewielki wpływ na transport kompleksów do ksylemu.
4. Po załadunku ksylemu, który zachodzi drogą apoplastyczną, kompleksy PbEDTA i CdEDTA transportowane są naczyniami do pędów wraz z prądem transpiracyjnym. Przy wysokim poziomie indukcji wystarczające jest minimalne natężenie transpiracji, aby zapewnić wysokie zawartości metali w częściach nadziemnych.
5. W górnych partiach łodygi i liściach kompleksy PbEDTA i CdEDTA opuszczają wiązki przewodzące i gromadzą się w przestworach i ścianach komórkowych. Znaczna część Pb pozostaje w liściach jako PbEDTA, część jednak ulega rozkładowi, w efekcie tworzy się $PbCO_3$ lub połączenia Pb z kwasami organicznymi. Aktualnie brak jest takich danych dla Cd.

5.2. Problemy związane ze stosowaniem fitoekstrakcji w warunkach polowych

5.2.1. Możliwość ługowania metali w glebie przez nadmiar związków chelatujących

Aby uzyskać wysoki poziom indukcji, bardzo często konieczne jest wprowadzenie do gleby EDTA w ilości 5—10 mmoli/kg gleby. W krótkim czasie wzrasta wtedy w roztworze glebowym stężenie kompleksów EDTA z metalami. Istnieje wówczas duże prawdopodobieństwo, że korzenie roślin nie potrafią pobrać całej puli skompleksowanych metali z gleby. W związku z tym pojawia się pro-

blem ługowania metali i ich transportu do wód podziemnych, wód powierzchniowych lub do sąsiednich ekosystemów. Takie zjawisko wymywania Cd, Cu, Pb i Zn po zastosowaniu związków kompleksujących zaobserwowało wielu autorów (Grčman i współpr., 2001; Römkens i współpr., 2002; Kos, Leštan, 2003; Wenzel i współpr., 2003).

Grčman i współpr. (2001), prowadząc badania lizymetryczne, obserwowali wysoką akumulację Pb i Cd w pędach *Brassica rapa* po wprowadzeniu 10 mmoli EDTA/kg gleby. Równocześnie stwierdzili pojawienie się w odciekach dużych ilości Pb i Cd. Powstawanie odcieków zawierających Pb i Cd po dodaniu 5 mmoli EDTA/kg gleby obserwowali także Chen i współpr. (2004b). Niebezpieczeństwo ługowania metali w wyniku działania EDTA jest przede wszystkim związane z dużą rozpuszczalnością i słabą adsorpcją na cząstkach glebowych kompleksów EDTA z Pb, Cd lub Zn (Wu i współpr., 2003), jak również z powolnym rozkładem tego związku chelatującego przez mikroorganizmy (Satroutdinov i współpr., 2000; Bucheli-Witschel, Egli, 2001). Powstawanie odcieków zawierających duże ilości metali obserwowano także po zastosowaniu innych niż EDTA związków chelatujących, na przykład EDGA (Römkens i współpr., 2002).

W ciągu ostatnich lat prowadzono wiele doświadczeń mających na celu rozwiązanie tego problemu. Jednym ze sposobów może być zastosowanie innych związków chelatujących (tabela 1), o znacznie krótszym czasie biodegradacji, jak na przykład EDDS czy NTA (Grčman i współpr., 2003; Kos, Leštan, 2003; Evangelou i współpr., 2007; Quartacci i współpr., 2007; Karczewska i współpr., 2008). Możliwe jest także zmniejszenie wymywania metali dzięki podawaniu EDTA do gleby w kilku mniejszych dawkach (Lasat, 2002; Lai, Chen, 2007; Leštan i współpr., 2008). Innym sposobem może się okazać równoczesne stosowanie dwóch lub więcej czynników indukujących. Na przykład Luo i współpr. (2006a) uzyskali wyższe zawartości Pb i Cd w pędach *Zea mays* po łącznym wprowadzeniu do gleby EDTA i EDDS, co umożliwiło zastosowanie mniejszych ilości związków kompleksujących. Bardzo podobne rezultaty z *Brassica juncea* otrzymali Cui i współpr. (2004), podając łącznie EDTA i siarkę elementarną, oraz Di Gregorio i współpr. (2006), wprowadzając EDTA, Triton X-100 (detergent) i bakterie *Sinorhizobium* sp. Także zastosowanie regulatorów roślinnych (López i współpr., 2005, 2007b; Israr, Sahi, 2008; Hadi i współpr., 2010), czynników stresowych (Luo i współpr., 2006b, 2006d i 2007) czy też omawianego w niniejszej monografii glifosatu może pozwolić na podawanie do gleby mniejszych ilości związków chelatujących. Problem wymywania metali może być również rozwiązany w wyniku przewiezienia zanieczyszczonej gleby do wcześniej przygotowanych stanowisk, zabezpieczonych przed powstawaniem odcieków, jak proponują McGrath i współpr. (2002).

Z zaprezentowanego przeglądu literatury wynika, że możliwe jest zmniejszenie ilości EDTA lub innych związków chelatujących, wprowadzanych do gleby w celu indukcji roślin, a tym samym ograniczenie możliwości ługowania metali. Mimo to problem ten nie jest jeszcze w pełni rozwiązany, co ogranicza stosowanie fitoekstrakcji indukowanej na dużą skalę oraz wymaga dalszych badań.

5.2.2. Zagospodarowanie zanieczyszczonego plonu po procesie fitoekstrakcji

Ważnym problemem, który przez długi czas był nierozwiązany, jest zagospodarowanie zanieczyszczonej metalami biomasy roślinnej uzyskanej po procesie fitoekstrakcji. Choć wielu autorów sugerowało różne metody pozbywania się zanieczyszczonego plonu (np. Kumar i współpracownicy, 1995; Salt i współpracownicy, 1995a; Alkorta i współpracownicy, 2004), to w rzeczywistości bardzo długo żadna z nich nie była zweryfikowana doświadczalnie.

Pierwsze krytyczne porównanie proponowanych metod oraz oszacowanie ich rzeczywistej przydatności do utylizacji biomasy roślinnej, zawierającej przede wszystkim Pb, Cd i Zn, przeprowadzili Sas-Nowosielska i współpracownicy (2004). Wyróżnili oni metody etapu wstępnego, polegającego tylko na ograniczeniu objętości biomasy, oraz metody ostatecznego pozbycia się zanieczyszczonego plonu. Do metod wstępnego zmniejszenia objętości toksycznego plonu zaliczyli: kompostowanie (ang. *composting*), rozkład termiczny, czyli pirolizę (ang. *pyrolysis*) oraz sprasowanie biomasy (ang. *compaction*). Spośród tych trzech metod kompostowanie zostało ocenione jako najmniej praktyczne, ze względu na możliwość powstawania odcieków zawierających wysokie stężenia metali, jak również czas trwania samego kompostowania (2–3 miesiące). Pozostały po tym procesie materiał roślinny („kompost”) musiałby być traktowany jako toksyczny i składowany na wysypiskach odpadów niebezpiecznych, co podnosiłoby koszty. Także sprasowanie daje w efekcie zanieczyszczone metalami odcieki i sprasowaną biomasę, które podobnie jak w przypadku kompostowania, należałoby odpowiednio zagospodarować. Spośród metod wstępnych za najskuteczniejszą w zmniejszaniu ilości biomasy i bezpieczną dla środowiska uznano pirolizę. Pozytywną cechą tego procesu jest bardzo znaczna redukcja biomasy, jak również powstawanie gazu pirolitycznego, który byłby produktem użytecznym i obniżającym koszty całego procesu. Mankamentem pirolizy są niewątpliwie wysokie koszty zakupu i użytkowania niezbędnej aparatury (Sas-Nowosielska i współpracownicy, 2004 i cytowana tam literatura).

Ostatecznymi sposobami pozbycia się zanieczyszczonego plonu są następujące metody: spalanie biomasy w hucie cynku i ołowiu lub w spalarni odpadów niebezpiecznych (ang. *incineration*), spopielenie, czyli spalanie w celu uzyskania bogatego w metale popiołu (ang. *ashing*), ekstrakcja biomasy z zastosowaniem ekstrahentów (np. EDTA), bezpośrednie składowanie na wysypiskach odpadów niebezpiecznych. Spośród wymienionych sposobów ostatecznej likwidacji plonu po fitoekstrakcji spalanie biomasy w hucie cynku i ołowiu, po dołączeniu jej do wsadu, uznano za najbardziej efektywne i przyjazne dla środowiska. W ten sposób można zmniejszyć o ponad 90% ilość suchej biomasy, a ponadto odzyskać część metali z tkanek roślinnych w trakcie procesu wytopu. Za najprostsze, a zarazem kosztowne i najmniej korzystne dla środowiska uznano składowanie biomasy na składowiskach odpadów niebezpiecznych. W tym przypadku ilość suchej masy roślinnej w krótkim czasie nie ulega zmniejszeniu, chociaż niewątpliwie zachodzi stopniowy rozkład materiału roślinnego na wysypisku (S a s - N o w o s i e l s k a i współpr., 2004). Opinie na temat składowania są jednak podzielone; niektórzy autorzy uznają ten sposób za najbardziej efektywny i niestanowiący zagrożenia dla środowiska (C h a n e y i współpr., 2007). Pozostałe dwa sposoby, czyli spopielenie oraz ekstrakcja, zostały ocenione jako bardzo obiecujące metody pozbywania się zanieczyszczonej biomasy, chociaż są dopiero na etapie prób laboratoryjnych. W przypadku ekstrakcji brak metod odzyskiwania metali oraz czystych ekstrahentów w celu ponownego ich użycia zdecydował o uznaniu tej metody za nienadającą się do zastosowania w skali makro (S a s - N o w o s i e l s k a i współpr., 2004).

Pierwsze badania, których efektem nie były jedynie przypuszczenia, ale rzeczywiste sprawdzenie skuteczności metod pozbywania się zanieczyszczonego metalami materiału roślinnego, opublikowali K e l l e r i współpr. (2005a). Autorzy ci użyli w badaniach biomasy *Thlaspi caerulescens* i *Salix viminalis*, pochodzącej z polowego eksperymentu fitoekstrakcji i zawierającej w przypadku *T. caerulescens* wysokie stężenia Zn i Cd. Porównano efekt spalania materiału roślinnego w warunkach tlenowych i beztlenowych, co miało odpowiadać spalaniu w spalarni odpadów niebezpiecznych lub pirolizie. Wyniki doświadczenia potwierdziły możliwość zastosowania obu metod, jednak znacznie lepsze rezultaty uzyskano w przypadku pirolizy. Autorzy stwierdzili, że piroliza zanieczyszczonej biomasy umożliwia zarówno otrzymanie pozostałości zawierającej niskie stężenia Cd i Zn, jak i odzyskanie odparowanych w trakcie procesu metali, z których Zn może być użyty do otrzymania koncentratu (wzbogaconej rudy), a pozostałość pozbawiona nadmiaru Cd mogłaby służyć jako nawóz (K e l l e r i współpr., 2005a). Podobne zjawisko znacznego obniżenia ilości biomasy oraz odparowania pierwiastka w trakcie pirolizy zaobserwowano przypadku materiału roślinnego zawierającego wysokie stężenia As (> 1 000 mg/kg) (Y a n i współpr., 2008). Tak więc pirolizę należy traktować jako metodę ostatecznego pozbycia się zanieczyszczonego plonu po procesie fitoekstrakcji, a nie jako me-

tość wstępnej redukcji objętości biomasy, jak to zaproponowali Nowosielska i współpracownicy (2004). Obecnie również ekstrakcję metali z materiału roślinnego należy zaliczyć do metod ostatecznej utylizacji. Nowsze badania wykazały bowiem, że możliwy jest prosty sposób rozbicia kompleksów EDTA z Cd, Cu, Ni, Pb lub Zn, uzyskanych po ekstrakcji zanieczyszczonej gleby, oraz doprowadzenie do wytrącenia i odzyskania metali z roztworu. Pozostały w roztworze czysty związek chelatujący można ponownie użyć do ekstrakcji (Di Palma i współpracownicy, 2005; Lim i współpracownicy, 2005; Zeng i współpracownicy, 2005; Finzgar, Leštan, 2008). Schemat przedstawiający nowy podział metod zagospodarowania zanieczyszczonego plonu zamieszczono na rys. 21.



Rys. 21. Metody zagospodarowania zanieczyszczonego plonu po procesie fitoekstrakcji metali

Zaprezentowane powyżej dane pokazują wyraźnie, że jest coraz więcej dostępnych, skutecznych i bezpiecznych dla środowiska metod utylizacji zanieczyszczonego plonu po procesie fitoekstrakcji, zatem dalszy rozwój metod fitoekstrakcji jest jak najbardziej uzasadniony.

6. Wnioski

1. Fuzikokcyna (10^{-6} M) i KCl (25—100 mM), stosowane razem w formie oprysku pędów gorzycy sarepskiej, istotnie zwiększyły transpirację roślin uprawianych hydroponicznie zarówno w pożywce podstawowej, jak i zawierającej EDTA oraz ołów i kadm. Chociaż całkowita ilość wytranspirowanej wody była w obu wariantach doświadczenia znacząco większa niż w kontroli, to dynamika tego wzrostu w czasie trwania eksperymentu była różna, w zależności od składu hydroponiki stosowanej do uprawy roślin.
2. W przypadku gorzycy sarepskiej, uprawianej hydroponicznie na pożywce zawierającej EDTA, Pb i Cd oraz traktowanej w formie oprysku części nadziemnych 10^{-6} M FC wraz z KCl, obserwuje się dodatnią korelację między transpiracją a zawartością ołowiu i kadmu w pędach. Wyraźną zależność między translokacją Pb i Cd a ich akumulacją w pędach obserwowano w ciągu pierwszych 20—35 godzin od czasu opryskania roślin. W procesach tych widoczne jest synergistyczne działanie fuzikokcyny i KCl. Występuje również wysoka, dodatnia korelacja między stężeniem KCl użytego do oprysku a zawartością Pb i Cd w pędach gorzycy, niezależna od transpiracji.
3. Po wprowadzeniu EDTA do pożywki zawartość pierwiastków o funkcjach fizjologicznych (K, Ca, Zn) w pędach gorzycy nie wskazuje na indukcję ich akumulacji przez ten czynnik chelatujący. Zawartość tych metali w pędach roślin opryskiwanych fuzikokcyną nie potwierdza również znacznej roli transpiracji w ich pobieraniu i translokacji do części nadziemnych.
4. W przypadku gorzycy i słonecznika, uprawianych w zanieczyszczonej metalami glebie z dodatkiem EDTA, nie stwierdzono korelacji między transpiracją a zawartością Pb i Cd w pędach. Nie obserwowano także synergistycznego wpływu fuzikokcyny i KCl na akumulację Pb i Cd w częściach nadziemnych, co potwierdzono w pędach gorzycy z upraw hydroponicznych. Z doświadczeń w kulturach wazonowych wynika, że w fitoekstrakcji indukowanej w tym układzie doświadczalnym poziom akumulacji Pb i Cd reguluje indukcja hyperakumulacji, a nie transpiracja.

5. Z porównania badań indukowanej fitoekstrakcji Pb i Cd z zastosowaniem czynników modyfikujących transpirację wynikają rozbieżności rezultatów uzyskanych w różnych układach doświadczalnych (hydroponiki lub kultury wazonowe na stałym podłożu). Dlatego odniesieniem do zastosowania opisanych doświadczeń w warunkach polowych powinny być raczej laboratoryjne eksperymenty z zastosowaniem kultur wazonowych.
6. Opryskanie pędów gorczycy i słonecznika glifosatem oraz wprowadzenie EDTA do zanieczyszczonej Pb, Cd i Zn gleby skutkowało znacznym wzrostem zawartości Pb i Cd w pędach, a poziom akumulacji metali był podobny w obu badanych gatunkach roślin.
7. Glifosat znacząco zwiększa przepuszczalność błon i wzmacnia indukcyjne działanie EDTA. Efektywność tego procesu wpływa na pobieranie i transport radialny w korzeniu kompleksów PbEDTA i CdEDTA przez endoderme drogą apoplastyczną i symplastyczną. Proces transpiracji ma w tym transporcie niewielką rolę.
8. Niewielka indukcja hyperakumulacji oraz związana z nią niska przepuszczalność błon decydują o transporcie kompleksów PbEDTA i CdEDTA, głównie drogą apoplastyczną. Transport ten zależy od transpiracji i może być modyfikowany przez czynniki wpływające na transpirację.

Literatura

- A b o u l r o o s S.A., H e l a l M.I.D., K a m e l M.M. 2006. Remediation of Pb and Cd polluted soils using in situ immobilization and phytoextraction techniques. *Soil Sediment Contam.*, 15: 199—215.
- A l d r i c h M.V., E l l z e y J.T., P e r a l t a - V i d e a J.R., G o n z a l e s J.H., G a r d e a - T o r r e s d e y J.L. 2004. Lead uptake and the effects of EDTA on lead-tissue concentration in the desert species mesquite (*Prosopis* spp.). *Int. J. Phytoremed.*, 6: 195—207.
- A l e k s a n d e r - K w a t e r c z a k U., H l i o s - R y b i c k a E. 2009. Contaminated sediments as a potential source of Zn, Pb, and Cd for a river system in the historical metalliferous or mining and smelting industry area of South Poland. *J. Soils Sediments*, 9: 13—22.
- A l k o r t a I., H e r n á n d e z - A l l i c a J., B e c e r r i l J.M., A m e z a g a I., A l b i z u I., O n a i n d i a M., G a r b i s u C. 2004. Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.*, 3: 55—70.
- A l m á s Å., S i n g h B.R., S a l b u B. 1999. Mobility of cadmium-109 and zinc-65 in soil influenced by equilibration time, temperature, and organic matter. *J. Environ. Qual.*, 28: 1742—1750.
- A l v a r e z - A y u s o E., G a r c i a - S a n c h e z A. 2003. Palygorskit as a feasible amendment to stabilize heavy metal polluted soils. *Environ. Pollut.*, 125: 337—344.
- A m r h e i n N., D e u s B., G e h r k e P., S t e i n r ü c k e n H.C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiol.*, 66: 830—834.
- A n t o s i e w i c z D.M. 1993. Mineral status of dicotyledonous crop plants in relation to their constitutional tolerance to lead. *Environ. Exp. Bot.*, 33: 575—589.
- A n t o s i e w i c z D.M. 2005. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ. Pollut.*, 134: 23—34.
- A n t o s i e w i c z D.M., H e n n i g J. 2004. Overexpression of *LCT1* in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environ. Pollut.*, 129: 237—245.
- A n t o s i e w i c z D.M., S i r k o A., S o w i Ń s k i P. 2008. Trace element transport in plants. In: Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health. Ed. M.N.V. Prasad. Chichester, England, John Wiley and Sons, Inc., s. 413—448.

- Arazi T., Sunkar R., Kaplan B., Fromm H. 1999. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.*, 20: 171—182.
- Assmann S.M. 2006. Solute transport. In: *Plant Physiology*. Eds. L. Taiz, E. Zeiger. Sunderland, USA, Sinaur Associates, Inc., s. 95—121.
- Assman S.M., Schwartz A. 1992. Synergistic effect of light and fusicoccin on stomatal opening. *Plant Physiol.*, 98: 1349—1355.
- Assunção A.G.L., Bookum W.M., Nelissen H.J.M., Vooijs R., Schat H., Ernst W.H.O. 2003. Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytol.*, 159: 411—419.
- Axelsen K.B., Palmgren M.G. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 126: 696—706.
- Badora A., Furrer G., Grünwald A., Schulin R. 1998. Immobilization of zinc and cadmium in polluted soils by polynuclear Al13 and Al-montmorillonite. *J. Soil Contam.*, 7: 573—588.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.D., Smith J.A.C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Eds. N. Terry, G. Bañuelos. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 85—107.
- Barabasz A., Wojas S., Dybek E., Antosiewicz D.M. 2008. Przydatność roślin zmodyfikowanych genetycznie do celów fitoekstrakcji i fitoewaporacji. *Biotechnologia*, 81: 68—83.
- Barrutia O., Garbisu C., Hernández-Allica J., Garcí-Plazaola J.I., Becerril J.M. 2010. Differences in EDTA-assisted metal phytoextraction between metallicolous and non-metallicolous accessions of *Rumex acetosa* L. *Environ. Pollut.*, 158: 1710—1715.
- Bauly J.M., Sealy I.M., Macdonald H., Brearley J., Dröge S., Hillmer S., Robinson D.G., Venis M.A., Blatt M.R., Lazarus C.M., Napier R.M. 2000. Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. *Plant Physiol.*, 124: 1229—1238.
- Baur J.R. 1979. Effect of glyphosate on auxin transport in corn and cotton. *Plant Physiol.*, 63: 882—886.
- Baur J.R., Bovey R.W., Veech J.A. 1977. Growth response in sorghum and wheat induced by glyphosate. *Weed Sci.*, 25: 238—240.
- Becker D., Hedrich R. 2002. Channeling auxin action: modulation of ion transport by indole-3-acetic acid. *Plant Mol. Biol.*, 49: 349—356.
- Bell P.F., McLaughlin M.J., Cozens G., Stevens D.P., Owens G., South H. 2003. Plant uptake of ¹⁴C-EDTA, ¹⁴C-Citrate, and ¹⁴C-Histidine from chelator-buffered and conventional hydroponic solutions. *Plant Soil*, 253: 311—319.
- Bennett F.A., Tyler E.K., Brooks R.R., Gregg P.E.H., Stewart R.B. 1998. Fertilization of hyperaccumulators to enhance their potential for phytoremediation and phytomining. In: *Plants that hyperaccumulate heavy metals. Their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining*. Ed. R.R. Brooks. Wallingford, UK, CAB INTERNATIONAL, s. 249—259.

- Bert V., Bonnin I., Saumitou-Laprade P., de Laguérie P., Petit D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallophilous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallophilous populations? *New Phytol.*, 155: 47—57.
- Berti W.R., Cunningham S.D. 2000. Phytostabilization of metals. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Eds. I. Raskin, B.D. Ensley. New York, USA, John Wiley & Sons, Inc., s. 71—88.
- Berti W.R., Cunningham S.D., Cooper E.M. 1998. Case studies in the field-in-place inactivation and phytoremediation of Pb-contaminated sites. In: *Metal-contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation*. Eds. J. Vangronsveld, S.D. Cunningham. Germany, Springer Verlag, s. 235—248.
- Blatt M.R., Grabov A. 1997. Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels. *Physiol. Plant.*, 100: 481—490.
- Blatt M.R., Thiel G. 1993. Hormonal control of ion channel gating. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44: 543—567.
- Blaylock M.J. 2000. Field demonstration of phytoremediation of lead-contaminated soils. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Eds. N. Terry, G. Bañuelos. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 1—12.
- Blaylock M.J., Huang J.W. 2000. Phytoextraction of metals. In: *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*. Eds. I. Raskin, B.D. Ensley. New York, USA, John Wiley & Sons, Inc., s. 53—70.
- Blaylock M.J., Salt D.E., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B.D., Raskin I. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 860—865.
- Bloom A.J. 2006. Mineral nutrition. In: *Plant Physiology*. Eds. L. Taiz, E. Zeiger. Sunderland, USA, Sinaur Associates, Inc., s. 73—93.
- Boonyapookana B., Parkpian P., Techapinyawat S., DeLaune R.D., Jug Sujinda A. 2005. Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiver zizanioides*). *J. Environ. Sci. Health*, A40: 117—137.
- Brault M., Amiar Z., Pennarum A.M., Monestiez M., Zhang Z., Cornle D., Dellis O., Knight H., Bouteau F., Rona J.P. 2004. Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. *Plant Physiol.*, 135: 231—243.
- Brecke B.J., Duke W.B. 1980. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. *Plant Physiol.*, 66: 656—659.
- Brej T. 1998. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. Populations from Legnica copper smelter area, Lower Silesia. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 67: 325—333.
- Brown S., Chaney R., Hallfrisch J., Ryan J.A., Berti W.R. 2004. In situ treatments to reduce the phyto- and bioavailability of lead, zinc, and cadmium. *J. Environ. Qual.*, 33: 522—531.
- Bucheli-Witschel M., Egli T. 2001. Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 69—106.

- Bunney T.D., van den Wijngaard P.W.J., de Boer A.H. 2002. 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. *Plant Mol. Biol.*, 50: 1041—1051.
- Burton J.D., Balke N.E. 1988. Glyphosate uptake by suspension-cultured potato (*Solanum tuberosum* and *S. brevidens*) cells. *Weed Sci.*, 36: 146—153.
- Burzyński M., Buczek J. 1998. Uptake and assimilation of ammonium ions by cucumber seedlings from solutions with different pH and addition of heavy metals. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 67: 197—200.
- Cabała J., Krupa P., Misz-Kennan M. 2009. Heavy metals in mycorrhizal rhizospheres contaminated by Zn-Pb mining and smelting around Olkusz in Southern Poland. *Water Air Soil Pollut.*, 199: 139—149.
- Cabała J., Teper L. 2007. Metalliferous constituents of rhizosphere soils contaminated by Zn-Pb mining in southern Poland. *Water, Air Soil Pollut.*, 178: 351—362.
- Chaney R.L., Angle J.S., Broadhurst C.L., Peters C.A., Tappero R.V., Sparks D.L. 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction phytomining technologies. *J. Environ. Qual.*, 36: 1429—1443.
- Chaney R.L., Li Y.-M., Brown S.L., Homer F.A., Malik M., Angle J.S., Baker A.J.M., Reeves R.D., Chin M. 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Eds. N. Terry, G. Bañuelos. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 129—158.
- Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8: 279—284.
- Chen B., Shen H., Li X., Feng G., Christie P. 2004a. Effects of EDTA application and arbuscular mycorrhizal colonization on growth and zinc uptake by maize (*Zea mays* L.) in soil experimentally contaminated with zinc. *Plant Soil*, 261: 219—229.
- Chen H., Cutright T. 2001. EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 45: 21—28.
- Chen H., Cutright T.J. 2002. The interactive effects of chelator, fertilizer, and rhizobacteria for enhancing phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *J. Soil Sediments*, 2: 203—210.
- Chen Q.Y., Tyrer M., Hills C.D., Yang X.M., Carey P. 2009. Immobilisation of heavy metals in cement-based solidification/stabilisation: a review. *Waste Manage.*, 29: 390—403.
- Chen Y.H., Li X.D., Shen Z.G. 2004b. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere*, 57: 187—196.
- Chen Y.H., Mao Y., He S.B., Guo P., Xu K. 2007. Heat stress increases the efficiency of EDTA in phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, 67: 1511—1517.
- Chen Y.X., Lin Q., Luo Y.M., He Y.F., Zhen S.J., Yu Y.L., Tian G.M., Wong M.H. 2003. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere*, 50: 807—811.

- Cherian S., Oliveira M.M. 2005. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 9377—9390.
- Chiang H-C., Lo J-C., Yeh K.-C. 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 6792—6798.
- Chiu K.K., Ye Z.H., Wong M.H. 2005. Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents. *Chemosphere*, 60: 1365—1375.
- Chlopecka A., Adriano D.C. 1997. Influence of zeolite, apatite and Fe-oxide on Cd and Pb uptake by crops. *Sci. Total Environ.*, 207: 195—206.
- Chmielnicka J. 1994. Metale i metaloidy. W: Toksykologia. Red. W. Seńczuk. Warszawa, PZWL, s. 301—353.
- Ciećko Z., Wyszkowski M., Krajewski W., Zabielska J. 2001. Effect of organic matter and liming on the reduction of cadmium uptake from soil by triticale and spring oilseed rape. *Sci. Total Environ.*, 281: 37—45.
- Claussen M., Lüthen H., Blatt M., Böttger M. 1997. Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta*, 208: 38—45.
- Clemens S., Antosiewicz D.M., Ward J.M., Schachtman D.P., Schroeder J.I. 1998. The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 12043—12048.
- Collins R.N., Onisko B.C., McLaughlin M.J., Merrington G. 2001. Determination of metal-EDTA complexes in soil solution and plant xylem by ion chromatography-electrospray mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 2589—2593.
- Coupland D. 1983. Influence of light, temperature and humidity on the translocation and activity of glyphosate in *Elymus repens* (= *Agropyron repens*). *Weed Res.*, 23: 347—355.
- Cui Y., Wang Q., Dong Y., Li H., Christie P. 2004. Enhanced uptake of soil Pb and Zn by Indian mustard and winter wheat following combined soil application of elemental sulphur and EDTA. *Plant Soil*, 261: 181—188.
- Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.*, 13: 393—397.
- Cunningham S.D., Ow D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.*, 110: 715—719.
- da Silva G.A., Lumini E., Maia L.C., Bonfate P., Bianciotto V. 2006. Phylogenetic analysis of *Glomeromycota* by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza*, 16: 183—189.
- Darra B.L., Saxena S.N. 1973. Role of IAA in the mineral composition of maize (*Zea mays*) crop under various osmotic stressed conditions. *Plant Soil*, 38: 657—661.
- David-Assael O., Berezin I., Shoshani-Knaani N., Saul H., Mizrachy-Dagri T., Chen J., Brook E., Shaul O. 2006. AtMHX is an auxin and ABA-regulated transporter whose expression pattern suggests a role in metal homeostasis in tissues with photosynthetic potential. *Funct. Plant. Biol.*, 33: 661—672.
- de la Rosa G., Peralta-Videoa J.R., Cruz-Jimenez G., Duarte-Gardea M., Martinez-Martinez A., Cano-Aguilera I., Sharma N.C., Sahi S.V., Gardea-Torresdey J.L. 2007. Role of ethy-

- lenediaminetetraacetic acid on lead uptake and translocation by tumbleweed (*Salsola kali* L.). *Environ. Toxicol. Chem.*, 26: 1033—1039.
- De Michelis M.I., Rasi-Caldogno F., Pugliarello M.C., Olivari C. 1996. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. III. Is there a direct interaction between the fusicoccin receptor and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.*, 110: 957—964.
- Degenhardt B., Gimmler H. 2000. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *J. Exp. Bot.*, 51: 595—603.
- Deléage-Grandon C., Chollet J.F., Faucher M., Rocher F., Komor E., Bonnemain J.L. 2001. Carrier-mediated uptake and phloem system of a 350-dalton chlorinated xenobiotic with an α -amino acid function. *Plant Physiol.*, 125: 1620—1632.
- Denis M.H., Delrot S. 1993. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiol. Plant.*, 87: 569—575.
- Devine M.D., Bandeen J.D., McKersie B.D. 1983. Temperature effects on glyphosate absorption, translocation, and distribution in quackgrass (*Agropyron repens*). *Weed Sci.*, 31: 461—464.
- Di Gregorio S., Barbafieri M., Lampis S., Sanangelantoni A.M., Tassi E., Vallini G. 2006. Combined application of Triton X-100 and *Sinorhizobium* sp. Pb002 inoculum for the improvement of lead phytoextraction by *Brassica juncea* in EDTA amended soil. *Chemosphere*, 63: 293—299.
- Di Palma L., Ferrantelli P., Medici F. 2005. Heavy metals extraction from contaminated soil: recovery of the flushing solution. *J. Environ. Manage.*, 77: 205—211.
- Dodd I.C. 2003. Hormonal interactions and stomatal response. *J. Plant Growth Regul.*, 22: 32—46.
- Douay F., Roussel H., Pruvot C., Loriette A., Fourrier H. 2008. Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in Northern France. *Sci. Total Environ.*, 401: 29—38.
- Drązkiewicz M., Tukendorf A., Baszyński T. 2003. Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation. *J. Plant Physiol.*, 160: 247—254.
- Duarte B., Delgado M., Caçador I. 2007. The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*. *Chemosphere*, 69: 836—840.
- Dushenkov S., Kapulnik Y. 2000. Phytofiltration of metals. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Eds. I. Raskin, B.D. Ensley. New York, USA, John Wiley & Sons, Inc., s. 89—106.
- Dushenkov S., Kapulnik Y., Blaylock M., Sorochinsky B., Raskin I., Ensley B. 1997a. Phytoremediation: a novel approach to an old problem. In: *Global environmental biotechnology*. Ed. D.L. Wise. Elsevier Science B.V., s. 563—572.
- Dushenkov S., Kumar P.B.A.N., Motto H., Raskin I. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.*, 29: 1239—1245.

- Dushenkov S., Vasudev D., Kapulnik Y., Gleba D., Fleisher D., Ting K.C., Ensley B. 1997b. Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 3468—3474.
- Ebbs S.D., Kochian L.V. 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Sci. Technol.*, 32: 802—806.
- Ebbs S.D., Lasat M.M., Brady D.J., Cornish J., Gordon R., Kochian L.V. 1997. Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, 26: 1424—1430.
- Edelmann H.G., Kutschera U. 1993. Rapid auxin-induced enhancement of protein biosynthesis in rye coleoptiles. *J. Plant Physiol.*, 142: 343—346.
- Enstone D.E., Peterson C.A. 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, Cell Environ.*, 28: 444—455.
- Enstone D.E., Peterson C.A., Ma F. 2003. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *J. Plant Growth Regul.*, 21: 335—351.
- Epelde L., Hernández-Allica J., Becerril J.M., Blanco F., Garbisu C. 2008. Effects of chelates on plants and soil microbial community: comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction. *Sci. Total Environ.*, 401: 21—28.
- Epstein A.L., Gussman C.D., Blaylock M.J., Yermiyahu U., Huang J.W., Kapulnik Y., Orser C.S. 1999. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil*, 208: 87—94.
- Ernst W.H.O. 1990. Mine vegetation in Europe. In: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. Ed. A.J. Shaw. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, Inc., s. 21—37.
- Etherton B., Rubinstein B. 1978. Evidence for amino acid-H⁺ co-transport in oat coleoptiles. *Plant Physiol.*, 61: 933—937.
- Evangelou M.W.H., Daghan H., Schaeffer A. 2004. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere*, 57: 207—213.
- Evangelou M.W.H., Ebel M., Schaeffer A. 2006. Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere*, 63: 996—1004.
- Evangelou M.W.H., Ebel M., Schaeffer A. 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68: 989—1003.
- Farwell A.J., Vesely S., Nero V., Rodriguez H., Shah S., Dixon D.G., Glick B.R. 2006. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil*, 288: 309—318.
- Felle H., Peters W., Palme K. 1991. The electrical response of maize to auxins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1064: 199—204.
- Fergusson J. 1991. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Oxford, England, Pergamon Press plc, s. 614.

- Fernandez C.H., Bayer D.E. 1977. Penetration, translocation, and toxicity of glyphosate in bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Weed Sci.*, 25: 396—400.
- Finzgar N., Leštan D. 2008. The two-phase leachnig of Pb, Zn and Cd contaminated soil using EDTA and electrochemical treatment of the washing solution. *Chemosphere*, 73: 1484—1491.
- Fischerová Z., Tlustoš P., Száková J., Šichorová K. 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ. Pollut.*, 144: 93—100.
- Flathman P.E., Lanza G.R. 1998. Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *J. Soil Contam.*, 7: 415—432.
- Florijn P.J., van Beusichem M.L. 1993. Cadmium distribution in maize inbred lines: effects of pH and level of Cd supply. *Plant Soil*, 153: 79—84.
- Fristad W.E., Elliott D.K., Royer M.D. 1996. EPA site emerging technology program: COGNIS TERRAMET® lead extraction process. *J. Air Waste Manage. Assoc.*, 46: 470—480.
- Fritioff Å., Greger M. 2007. Fate of cadmium in *Elodea canadensis*. *Chemosphere*, 67: 365—375.
- Fuchs M.A., Geiger D.R., Reynolds T.L., Bourque J.E. 2002. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* medikus). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 74: 27—39.
- Gabara B., Krajewska M. 1997. Effect of calcium and toxic metals on RNA synthesis and transport in cortex cells of root meristem of *Pisum sativum* L. *Polish J. Environ. Stud.*, 6 (3): 35—40.
- Gadallah M.A.A., El-Enany A.E. 1999. Role of kinetin in alleviation of copper and zinc toxicity in *Lupinus termis* plants. *Plant Growth Regul.*, 29: 151—160.
- Gadapati W.R., Macfie S.M. 2006. Phytochelatins are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*. *Plant Sci.*, 170: 471—480.
- Galiulin R.V., Bashkin V.N., Galiulina R.R., Kucharski R., Małkowski E., Marchwińska E. 1998. The impact of phytoextraction effectors on the enzymatic activity of soil contaminated by heavy metals. *Agr. Chem.*, 2 (3): 243—251.
- Gancarczyk-Gola M., Palowski B. 2005. Metale ciężkie i pH powierzchniowych warstw gleby wokół centrów przemysłowych oraz na terenach wolnych od zanieczyszczeń. *Rocz. Glebozn.*, 56, 1/2: 59—66.
- Garbisu C., Alkorta I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technol.*, 77: 229—236.
- Gardea-Torresdey J.L., Gonzales J.H., Tiemann K.J., Rodriguez O., Gamez G. 1998. Phytofiltration of hazardous cadmium, chromium, lead and zinc ions by biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa). *J. Hazard. Mater.*, 57: 29—39.
- Gascó A., Salleo S., Gortan E., Nardini A. 2007. Seasonal changes in the ion-mediated increase of xylem hydraulic conductivity in stems of three evergreens: any functional role? *Physiol. Plant.*, 129: 597—606.

- Gasic K., Korban S.S. 2007. Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta*, 225: 1277—1285.
- Gazizov I.S., Zyalalov A.A., Ionenko I.F., Gazizova N.I. 1995. Water uptake by plants as affected by infusion of a potassium salt into shoots. *Russ. J. Plant Physiol.*, 42: 386—390.
- Geebelen W., Sappin-Didier V., Ruttens A., Carleer R., Yperman J., Bongué-Boma K., Mench M., van der Lelie N., Vangronsveld J. 2006. Evaluation of cyclonic ash, commercial Na-silicates, lime and phosphoric acid for metal immobilisation purposes in contaminated soils in Flanders (Belgium). *Environ. Pollut.*, 144: 32—39.
- Geebelen W., Vangronsveld J., Adriano D.C., van Poucke L.C., Clijsters H. 2002. Effects of Pb-EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 115: 377—384.
- Gehring C.A., McConchie R.M., Venis M.A., Parish R.W. 1998. Auxin-binding-protein antibodies and peptides influence stomatal opening and alter cytoplasmic pH. *Planta*, 205: 581—586.
- Geiger D.R., Kapitan S.W., Tucci M.A. 1986. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiol.*, 82: 468—472.
- Gerhardt K.E., Huang X-D., Glick B.R., Greenberg B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.*, 176: 20—30.
- Ghestem J.P., Bermond A. 1998. EDTA extractibility of trace metals in polluted soils: a chemical-physical study. *Environ. Sci. Technol.*, 19: 409—416.
- Ghosh M., Singh S.P. 2005. A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environ. Pollut.*, 133: 365—371.
- Gisbert C., Ros R., DeHaro A., Walker D.J., Bernal M.P., Serano R., Navarro-Aviño J.A. 2003. Plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303: 440—445.
- Gleba D., Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M., Dushenkov S., Logendra S., Gleba Y.Y., Raskin I. 1999. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5973—5977.
- Gliński J. 1999. Chemiczne i fizykochemiczne właściwości gleb. W: *Gleboznawstwo*. Red. S. Zawadzki. Warszawa, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, s. 183—236.
- Godzik B. 1993. Heavy metals content in plants from zinc dumps and reference areas. *Polish Bot. Stud.*, 5: 113—132.
- Goh C., Oku T., Schimazaki K. 1995. Properties of Proton Pumping in Response to Blue Light and Fusicocin in Guard Cell Protoplasts Isolated from Adaxial Epidermis of *Vicia* Leaves. *Plant Physiol.*, 109: 187—194.
- Gorinova N., Nedkovska M., Todorovska E., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Georgieva K., Demirevska-Kepova K., Atanassova A., Herzig R. 2007. Improved phytoaccumulation of cadmium

- by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environ. Pollut.*, 145: 161—170.
- Grčman H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B., Leštan D. 2001. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant Soil*, 235: 105—114.
- Grčman H., Vodnik D., Velikonja-Bolta Š., Leštan D. 2003. Ethylenediaminedisuccinate as new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. *J. Environ. Qual.*, 32: 500—506.
- Greger M., Lindberg S. 1986. Effects of Cd²⁺ and EDTA on young sugar beet (*Beta vulgaris*). I. Cd²⁺ uptake and sugar accumulation. *Physiol. Plant.*, 66: 69—74.
- Gresshoff P.M. 1979. Growth inhibition by glyphosate and reversal of its action by phenylalanine and tyrosine. *Aust. J. Plant Physiol.*, 6: 177—185.
- Grichko V.P., Filby B., Glick B.R. 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *J. Biotechnol.*, 81: 45—53.
- Grodzińska K., Korzeniak U., Szarek-Łukaszevska G., Godzik B. 2000. Colonization of zinc mine spoils in southern Poland — preliminary studies on vegetation, seed rain and seed bank. *Fragm. Flor. Geobot.*, 45(1—2): 123—145.
- Gucwa-Przepióra E., Małkowski E., Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Krzyżak J., Kita A., Römkens P.F.M. 2007. Effect of chemophytostabilization practices on arbuscular mycorrhiza colonization of *Deschampsia cespitosa* ecotype Waryński at different soil depths. *Environ. Pollut.*, 150: 338—346.
- Gucwa-Przepióra E., Turnau K. 2001. Arbuscular mycorrhiza and plant succession on zinc smelter spoil heap in Katowice-Wielowiec. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 70: 153—158.
- Gworek B. 1992. Lead inactivation in soils by zeolites. *Plant Soil*, 143: 71—74.
- Gworek B., Barański A., Kondzielski I., Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E., Nogaj K., Rzychoń D., Worsztynowicz A. 2004. Technologie rekultywacji gleb. Monografia. Red. B. Gworek. Warszawa, Instytut Ochrony Środowiska, s. 111.
- Gworek B., Borowiak M., Kwapisz J. 1998. Effect of zeolite-bearing rocks upon inactivation of cadmium in soils. *Rocz. Glebozn.*, 49 (1—2): 71—78.
- Gworek B., Brogowski Z., Jeske K. 1996. Oddziaływanie syntetycznych zeolitów na pobieranie z gleby metali ciężkich przez sałatę nawożoną osadem ściekowym. *Rocz. Glebozn.*, 47 (1—2): 47—53.
- Gwóźdź E.A., Kopyra M. 2003. Reakcje komórek roślinnych na metale ciężkie – aspekty biotechnologiczne. *Biotechnologia*, 62 (3): 107—123.
- Gzyl J. 1995. Ecological impact and remediation of contaminated sites around lead smelters in Poland. *J. Geochem. Explor.*, 52: 251—258.
- Haag-Kerwer A., Schäfer H.J., Heiss S., Walter C., Rausch T. 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, 50: 1827—1835.

- Haderlie L.C., Widholm J.M., Slife F.W. 1977. Effect of glyphosate on carrot and tobacco cells. *Plant Physiol.*, 60: 40—43.
- Hadi F., Bano A., Fuller M.P. 2010. The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zea mays* L.): the role of plant growth regulators (GA₃ and IAA) and EDTA alone and in combinations. *Chemosphere*, 80: 457—462.
- Hager A., Debus G., Edel H.G., Stransky H., Serrano R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185: 527—537.
- Hall J.L., Williams L.E. 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.*, 54: 2601—2613.
- Hammer D., Keller C., McLaughlin M.J., Hamon R.E. 2006. Fixation of metals in soil constituents and potential remobilization by hyperaccumulating and non-hyperaccumulating plants: results from an isotopic dilution study. *Environ. Pollut.*, 143: 407—415.
- Heckenberger U., Schurr U., Schulze E.-D. 1996. Stomatal response to abscisic acid fed into the xylem of intact *Helianthus annuus* (L.) plants. *J. Exp. Bot.*, 47: 1405—1412.
- Hernández-Allica J., Garbisu C., Barrutia O., Becerril J.M. 2007. EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. *Environ. Exp. Bot.*, 60: 26—32.
- Hetherington P.R., Marshall G., Kirkwood R.C., Warner J.M. 1998. Absorption and efflux of glyphosate by cell suspensions. *J. Exp. Bot.*, 49: 527—533.
- Hetherington P.R., Reynolds T.L., Marshall G., Kirkwood R.C. 1999. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. *J. Exp. Bot.*, 50: 1567—1576.
- Holger E., Sakanakura H., Matsumoto T., Tanaka N., Lagerkvist A. 2001. Effect of electric arc vitrification of bottom ash on the mobility and fate of metals. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 1531—1536.
- Holländer H., Amrhein N. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.*, 66: 823—829.
- Horn A.J. 2000. Phytoremediation by constructed wetlands. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Eds. N. Terry, G. Bañuelos. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 13—39.
- Hsu Y.T., Kao C.H. 2003. Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Cell Environ.*, 26: 867—874.
- Huang J.W., Chen J., Berti W.R., Cunningham S.D. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 800—805.
- Huang J.W., Cunningham S.D. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.*, 134: 75—84.
- Huang J.W., Poynton C.Y., Kochian L.V., Ellers M.P. 2004. Phytofiltration of arsenic from drinking water using arsenic-hyperaccumulating ferns. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 3412—3417.

- Irving H.R., Ghering C.A., Parish R.W. 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1790—1794.
- Israr M., Sahi S.V. 2008. Promising role of plant hormones in translocation of lead in *Sesbania drummondii* shoots. *Environ. Pollut.*, 153: 29—36.
- Jachetta J.J., Appleby A.P., Boersma L. 1986. Apolastic and symplastic pathways of atrazine and glyphosate transport in shoots of seedling sunflower. *Plant Physiol.*, 82: 1000—1007.
- James C.A., Strand S.E. 2009. Phytoremediation of small organic contaminants using transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20: 237—241.
- Jankiewicz L.S. 1997a. Pojęcia ogólne oraz terminologia dotycząca wzrostu i rozwoju. W: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*. Red. L.S. Jankiewicz. T. 1. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 13—16.
- Jankiewicz L.S. 1997b. Inne regulatory roślinne. W: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*. Red. L.S. Jankiewicz. T. 1. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 169—187.
- Jankiewicz L.S. 1997c. Auksyny. W: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*. Red. L.S. Jankiewicz. T. 1. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 17—40.
- Jarvis M.D., Leung D.W.M. 2001. Chelated lead transport in *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) link ssp. *proliferus* var. *palmensis* (H. Christ): an ultrastructural study. *Plant Sci.*, 161: 433—441.
- Jarvis M.D., Leung D.W.M. 2002. Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environ. Exp. Bot.*, 48: 21—32.
- Jasiewicz C., Antonkiewicz J. 2000. Wpływ zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi na skład chemiczny kukurydzy. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 471: 937—943.
- Jayaweera M.W., Kasturiarachchi J.C., Kularatne R.K.A., Wijeyekoon S.L.J. 2008. Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. *J. Environ. Manage.*, 87: 450—460.
- Jiang X.J., Luo Y.M., Zhao Q.G., Baker A.J.M., Christie P., Wong M.H. 2003. Soil Cd availability to Indian mustard and environmental risk following EDTA addition to Cd-contaminated soil. *Chemosphere*, 50: 813—818.
- Jørgensen S.E. 1993. Removal of heavy metals from compost and soil by ecotechnological methods. *Ecol. Eng.*, 2: 89—100.
- Jungk A.O. 2002. Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. In: *Plant roots, the hidden half*. Eds. Y. Waisel, A. Eshel, U. Kafkafi. New York, USA, Marcel Dekker, Inc., s. 587—616.
- Jurkiewicz A., Orłowska E., Anielska T., Godzik B., Turnau K. 2004. The influence of mycorrhiza and EDTA application on heavy metal uptake by different maize varieties. *Acta Biol. Cracov. Bot.*, 46: 7—18.
- Kabata-Pendias A. 1977. Metale ciężkie w roślinach rosnących na odpadach flotacyjnych przemysłu miedziowego. *Roczn. Glebozn.*, 28 (2): 141—152.
- Kabata-Pendias A., Pendias H. 1999. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. Warszawa, PWN, s. 397.

- Kabata-Pendias A., Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC.
- Karahara I., Ikeda A., Kondo T., Uetake Y. 2004. Development of Casparina strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta*, 219: 41—47.
- Karcz W., Burdach Z. 2007. Effect of temperature on growth, proton extrusion and membrane potential in maize (*Zea mays* L.) coleoptile segments. *Plant Growth Regul.*, 52: 141—150.
- Karcz W., Kurtyka R. 2007. Effect of cadmium on growth, proton extrusion and membrane potential in maize coleoptile segments. *Biol. Plant.*, 51: 713—719.
- Karczewska A. 2003. Perspektywy zastosowania fitoremediacji w rekultywacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi. *Ochrona Środ. Zasob. Nat.*, 25/26: 27—54.
- Karczewska A., Bogda A., Gałka B., Szulc A., Czwardziel D., Duszyńska D. 2006. Natural and anthropogenic soil enrichment in heavy metals in areas of former metallic ore mining in the Sudety mts. *Pol. J. Soil Sci.*, 39: 131—142.
- Karczewska A., Kabała C., Gałka B., Kocan K., Orłów K. 2008. Zmiany rozpuszczalności miedzi, ołowiu i cynku oraz ich pobieranie przez kukurydzę w doświadczeniu nad zastosowaniem indukowanej fitoekstrakcji z gleb zanieczyszczonych emisjami huty miedzi. *Roczn. Glebozn.*, 59 (3/4): 97—107.
- Kärenlampi S., Schat H., Vangronsveld J., Verkleij J.A.C., van der Lelie D., Mergeay M., Tervahauta A.I. 2000. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environ. Pollut.*, 107: 225—231.
- Kayser A., Wenger K., Keller A., Attinger W., Felix H.R., Gupta S.K., Schulin R. 2000. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulfur amendments. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 1778—1783.
- Keller C., Hammer D., Kayser A., Richner W., Brodbeck M., Sennhauser M. 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant Soil*, 249: 67—81.
- Keller C., Ludwig C., Davoli F., Wochele J. 2005a. Thermal treatment of metal-enriched biomass produced from heavy metal phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 3359—3367.
- Keller C., Marchetti M., Rossi L., Lugon-Moulin N. 2005b. Reduction of cadmium availability to tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants using soil amendments in low cadmium-contaminated agricultural soils: a pot experiment. *Plant Soil*, 276: 69—84.
- Kern J., Idler C. 1999. Treatment of domestic and agricultural wastewater by reed bed systems. *Ecol. Eng.*, 12: 13—25.
- Kirkham M.B. 2000. EDTA-facilitated phytoremediation of soil with heavy metals from sewage sludge. *Int. J. Phytoremed.*, 2: 159—172.
- Kłapcińska B. 1989. Mechanizmy akumulacji i wiązania germanu oraz ołowiu przez *Pseudomonas putida*. Katowice, Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, s. 119.

- Knox A.S., Kaplan D.I., Adriano D.C., Hinton T.G., Wilson M.D. 2003. Apatite and phillipsite as sequestering agents for metals and radionuclides. *J. Environ. Qual.*, 32: 515—525.
- Knox A.S., Paller M.H., Nelson E.A., Specht W.L., Halverson N.V., Gladden J.B. 2006. Metal distribution and stability in constructed wetland sediment. *J. Environ. Qual.*, 35: 1948—1959.
- Knox A.S., Seaman J., Adriano D.C. 2000a. Chemophytostabilization of metals in contaminated soils. In: *Bioremediation of contaminated soils*. Eds. D.L. Wise, D.J. Trantolo, E.J. Cichon, H.I. Inyang, U. Stottmeister. Monticello, USA, Marcel Dekker, Inc., s. 811—836.
- Knox A.S., Seaman J., Mench M.J., Vangronsveld J. 2000b. Remediation of metal- and radionuclides-contaminated soils by in situ stabilization techniques. In: *Environmental restoration of metals-contaminated soils*. Ed. I.K. Iskandar. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 21—60.
- Komárek M., Tlustoš P., Száková J., Chrastný V., Ettler V. 2007. The use of maize and poplar in chelant-enhanced phytoextraction of lead from contaminated agricultural soils. *Chemosphere*, 67: 640—651.
- Kos B., Leštan D. 2003. Influence of a biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant Soil*, 253: 403—411.
- Kos B., Leštan D. 2004a. Soil washing of Pb, Zn and Cd using biodegradable chelator and permeable barriers and induced phytoextraction by *Cannabis sativa*. *Plant Soil*, 263: 43—51.
- Kos B., Leštan D. 2004b. Chelator induced phytoextraction and in situ soil washing of Cu. *Environ. Pollut.*, 132: 333—339.
- Krämer U. 2005. MTP1 mops up excess zinc in *Arabidopsis* cells. *Trends Plant Sci.*, 10: 313—315.
- Krämer U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 133—141.
- Krämer U., Talke I.N., Hanikenne M. 2007. Transition metal transport. *FEBS Lett.*, 581: 2263—2272.
- Kubik M. 1997. Kwas abscysynowy. W: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*. Red. L.S. Jankiewicz. T. 1. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 83—94.
- Kucharski R., Marchwińska E., Gzyl J. 1994. Agricultural policy in polluted areas. *Ecol. Eng.*, 3: 299—312.
- Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E. 1997a. Final report 1997. Integrated approach to the remediation of heavy metal-contaminated land, U.S. Department of Energy.
- Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E. 1997b. Treatability study report. Integrated approach to the remediation of heavy metal-contaminated land, U.S. Department of Energy.
- Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E. 1998. Treatability study report. Integrated approach to the remediation of heavy metal-contaminated land, U.S. Department of Energy.

- Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E., Japenga J., Kuperberg J.M., Pogrzeba M., Krzyżak J. 2005. The use of indigenous plant species and calcium phosphate for the stabilization of highly metal-polluted sites in southern Poland. *Plant Soil*, 273: 291—305.
- Kulli B., Balmer M., Krebs R., Lothenbach B., Geiger G., Schulin R. 1999. The influence of nitrilotriacetate on heavy metal uptake of lettuce and ryegrass. *J. Environ. Qual.*, 28: 1699—1705.
- Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.*, 29: 1232—1238.
- Kumpiene J., Guerri G., Landi L., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G. 2009. Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ. Saf.*, 72: 115—119.
- Küpper H., Lombi E., Zhao F.-J., McGrath S.P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212: 75—84.
- Kurczyńska E.U., Gaj D.M., Ujczak A., Mazur E. 2007. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 226: 619—628.
- Kurczyńska E.U., Hejnowicz Z. 1991. Differentiation of circular vessels in isolated segments of *Fraxinus excelsior*. *Physiol. Plant.*, 83: 275—280.
- Kurtyka R., Małkowski E., Kita A., Karcz W. 2008. Effect of calcium and cadmium on growth and accumulation of cadmium, calcium, potassium and sodium in maize seedlings. *Polish J. Environ. Stud.*, 17: 51—56.
- Kutschera U. 1996. Cessation of cell elongation in rye coleoptiles is accompanied by loss of cell-wall plasticity. *J. Exp. Bot.*, 47: 1387—1394.
- Lai H.Y., Chen Z.S. 2007. Multi-dose applying EDTA to decrease the potential groundwater contamination using rainbow pink (*Dianthus chinensis*) for enhanced phytoextraction. *Desalination*, 210: 236—247.
- Laperche V. 2000. Immobilization of lead by in situ formation of lead phosphates in soils. In: *Environmental restoration of metals-contaminated soils*. Ed. I.K. Iskandar. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 61—76.
- Larbi A., Morales F., Abadia A., Gogorcena Y., Lucena J.J., Abadia J. 2002. Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Funct. Plant Biol.*, 29: 1453—1464.
- La Rosa P.C., Hasegawa P.M., Rhodes D., Clithero J.M., Watad A.E.A., Bressan R.A. 1987. Abscisic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.*, 85: 174—181.
- Lasat M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.*, 31: 109—120.
- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. 1996. Physiological characterization of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol.*, 112: 1715—1722.

- Lee M., Yang M. 2010. Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L var. *Vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater. *J. Hazard. Mater.*, 173: 589—596.
- Lee S., Moon J.S., Ko T.-S., Petros D., Goldsbrough P.B., Korban S.S. 2003a. Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.*, 131: 656—663.
- Lee S., Petros D., Moon J.S., Ko T.-S., Goldsbrough P.B., Korban S.S. 2003b. Higher levels of ectopic expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase do not lead to increased cadmium tolerance and accumulation. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 903—910.
- Lee T.T., Dumas T. 1983. Effect of glyphosate on ethylen production in tobacco callus. *Plant Physiol.*, 72: 855—857.
- Lee Y., Choi Y.B., Suh S., Lee J., Assmann S.M., Joe C.O., Kelleher J.F., Crain R.C. 1996. Abscisic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol.*, 110: 987—996.
- Legocka J. 1997. Działanie regulatorów wzrostu w roślinie. W: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*. Red. L.S. Jankiewicz. T. 1. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 199—225.
- Lesage E., Meers E., Vervaeke P., Lamsal S.A., Hopgood M., Tack F.M.G., Verloo M.G. 2005. Enhanced phytoextraction: II. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus annuus* from calcareous soil. *Int. J. Phytoremed.*, 7: 143—152.
- Leštan D., Lou C.-L., Li X.-D. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: a review. *Environ. Pollut.*, 153: 3—13.
- Leung J., Giraudat J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 199—222.
- Lim T.T., Chui P.C., Goh K.H. 2005. Process evaluation for optimization of EDTA use and recovery for heavy metal removal from a contaminated soil. *Chemosphere*, 58: 1031—1040.
- Lin C., Liu J., Liu L., Zhu T., Sheng L., Wang D. 2009. Soil amendment application frequency contributes to phytoextraction of lead by sunflower at different nutrient levels. *Environ. Exp. Bot.*, 65: 410—416.
- Liphadzi M.S., Kirkham M.B., Mankin K.R., Paulsen G.M. 2003. EDTA-assisted heavy-metal uptake by poplar and sunflower grown at a long-term sewage-sludge farm. *Plant Soil*, 257: 171—182.
- Lock K., Janssen C.R. 2001. Ecotoxicity of zinc spiked artificial soils versus contaminated field soils. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 4295—4300.
- Lock K., Janssen C.R. 2003. Influence of ageing on zinc bioavailability in soils. *Environ. Pollut.*, 126: 371—374.
- Lombi E., Zhao F.-J., Zhang G., Sun B., Fitz W., Zhang H., McGrath S.P. 2002. In situ fixation of metals in soils using bauxite residue: chemical assessment. *Environ. Pollut.*, 118: 435—443.
- Lothenbach B., Krebs R., Furrer G., Gupta S.K., Schulin R. 1998. Immobilization of cadmium and zinc in soil by Al-montmorillonite and gravel sludge. *Eur. J. Soil Sci.*, 49: 141—148.

- Lou L.Q., Ye Z.H., Wong M.H. 2007. Solubility and accumulation of metals in Chinese brake fern, vetiver and rostrate sesbania using chelating agents. *Int. J. Phytoremed.*, 9: 325—343.
- López M.L., Peralta-Videa J.R., Benitez T., Duarte-Gardea M., Gardea-Torresdey J.L. 2007a. Effects of lead, EDTA, and IAA on nutrient uptake by alfalfa plants. *J. Plant Nutr.*, 30: 1247—1261.
- López M.L., Peralta-Videa J.R., Benitez T., Gardea-Torresdey J.L. 2005. Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere*, 61: 595—598.
- López M.L., Peralta-Videa J.R., Parsons J.G., Benitez T., Gardea-Torresdey J.L. 2007b. Gibberellic acid, kinetin, and the mixture indole-3-acetic acid-kinetin assisted with EDTA-induced lead hyperaccumulation in alfalfa plants. *Environ. Sci. Technol.*, 41: 8165—8170.
- López M.L., Peralta-Videa J.R., Parsons J.G., Gardea-Torresdey J.L., Duarte-Gardea M. 2009. Effect of indole-3-acetic acid, kinetin, and ethylenediaminetetraacetic acid on plant growth and uptake and translocation of lead, micronutrients, and macronutrients in alfalfa plants. *Int. J. Phytoremed.*, 11: 131—149.
- Luo C.L., Shen Z.G., Baker A.J.M., Li X.D. 2006d. A novel strategy using biodegradable EDDS for the chemically enhanced phytoextraction of soils contaminated with heavy metals. *Plant Soil.*, 285: 67—80.
- Luo C.L., Shen Z.G., Li X.D., Baker A.J.M. 2006b. The role of root damage in the chelate-induced accumulation of lead by Indian mustard plants. *Int. J. Phytoremed.*, 8: 323—337.
- Luo C.L., Shen Z.G., Li X.D. 2005. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 59: 1—11.
- Luo C.L., Shen Z.G., Li X.D. 2007. Plant uptake and the leaching of metals during the hot EDDS-enhanced phytoextraction process. *Int. J. Phytoremed.*, 9: 181—196.
- Luo C.L., Shen Z.G., Li X.D., Baker A.J.M. 2006a. Enhanced phytoextraction of Pb and other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 63: 1773—1784.
- Luo C.L., Shen Z.G., Lou L., Li X.D. 2006c. EDDS and EDTA-enhanced phytoextraction of metals from artificially contaminated soil and residual effects of chelant compounds. *Environ. Pollut.*, 144: 862—871.
- Macnair M.R. 2002. Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytol.*, 155: 59—66.
- Madrid F., Romero A.S., Madrid L., Maqueda C. 2006. Reduction of availability of trace metals in urban soils using inorganic amendments. *Environ. Geochem. Health*, 28: 365—373.
- Małkowski E. 1993. Wpływ jonów ołowianych na wzrost roślin. Katowice, Uniwersytet Śląski [Maszynopis pracy doktorskiej].
- Małkowski E., Kita A., Galas W., Karcz W., Kuperberg J.M. 2002. Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on the growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regul.*, 37: 69—76.

- Małkowski E., Kurtyka R. 2003. Mechanizmy hyperakumulacji cynku i kadmu w roślinach. *Post. Biol. Kom.*, 30: 483—496.
- Małkowski E., Pogrzeba M., Kuperberg M. 2003. Release of arsenic after application of phosphates into lead and cadmium contaminated soil. In: *Proceedings of Sixth International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States*, 1—4 September, Prague, Czech Republic [maszynopis, s. 1—5 (CD-ROM)].
- Małkowski E., Sas-Nowosielska A., Kucharski R. 1997. Effect of regulation of transpiration intensity on accumulation of lead and cadmium in above-ground parts of plants. In: *Integrated approach to the remediation of heavy metal-contaminated land. Final report 1997*. Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E., U.S. Department of Energy.
- Marcus A.I., Moore R.C., Cyr R.J. 2001. The role of microtubules in guard cell function. *Plant Physiol.*, 125: 387—395.
- Marecik R., Króliczak P., Cyplik P. 2006. Fitoremediacja — alternatywa dla tradycyjnych metod oczyszczania środowiska. *Biotechnologia*, 74 (3): 88—97.
- Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. London, Great Britain, Academic Press Ltd., s. 889.
- Martinez M., Bernal P., Almela C., Vélez D., Garcia-Agustin P., Serrano R., Navarro-Aviño J.A. 2006. An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere*, 64: 478—485.
- Mayes W.M., Batty L.C., Younger P.L., Jarvis A.P., Kõiv M., Vohla C., Mander U. 2009. Wetland treatment at extremes of pH: a review. *Sci. Total Environ.*, 407: 3944—3957.
- McGrath S.P., Dunham S.J., Correll R.L. 2000. Potential for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Eds. N. Terry, G. Bañuelos. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 109—128.
- McGrath S.P., Zhao F.-J. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14: 277—282.
- McGrath S.P., Zhao F.-J., Lombi E. 2002. Phyto remediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agronom.*, 75: 1—56.
- Meagher R.B., Rugh C.L., Kandasamy M.K., Gragson G., Wang N.J. 2000. Engineered phyto remediation of mercury pollution in soil and water using bacterial genes. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Eds. N. Terry, G. Bañuelos. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 201—219.
- Meers E., Hopgood M., Lesage E., Vervaeke P., Tack F.M.G., Verloo M.G. 2004. Enhanced phytoextraction: in search of EDTA alternatives. *Int. J. Phytoremed.*, 6: 95—109.
- Meers E., Ruttens A., Hopgood M., Lesage E., Tack F.M.G. 2005. Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. *Chemosphere*, 61: 561—572.

- Meers E., Tack F.M.G., Van Slycken S., Ruttens A., Vangronsveld J., Verloo M.G. 2008. Chemically assisted phytoextraction: a review of potential soil amendments for increasing plant uptake of heavy metals. *Int. J. Phyto-remed.*, 10: 390—414.
- Mench M., Bussi re S., Boisson J., Castaing E., Vangronsveld J., Ruttens A., DeKoe T., Bleeker P., Assun o A., Manceau A. 2003. Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after *in situ* treatments. *Plant Soil*, 249: 187—202.
- Mench M., Renella G., Gelsomino A., Landi L., Nannipieri P. 2006a. Biochemical parameters and bacterial species richness in soils contaminated by sludge-borne metals and remediated with inorganic soil amendments. *Environ. Pollut.*, 144: 24—31.
- Mench M., Vangronsveld J., Beckx C., Ruttens A. 2006b. Progress in assisted natural remediation of an arsenic contaminated agricultural soil. *Environ. Pollut.*, 144: 51—61.
- Mench M., Vangronsveld J., Clijsters H., Lepp N.W., Edwards R. 2000. In situ immobilization and phytostabilization of contaminated soils. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Eds. N. Terry, G. Bañuelos. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC, s. 323—358.
- Mengel K., Kirkby E.A., Kosegarten H., Appel T. 2001. Principles of plant nutrition. The Netherlands, Kluwer Academic Publisher, s. 849.
- Mervosh T.L., Balke N.E. 1991. Effects of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. *Weed Sci.*, 39: 347—353.
- Meyers D.E.R., Auchterlonie G.J., Webb R.I., Wood B. 2008. Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environ. Pollut.*, 153: 323—332.
- Misra V., Chaturvedi P.K. 2007. Plant uptake/bioavailability of heavy metals from contaminated soil after treatment with humus soil and hydroxyapatite. *Environ. Monit. Assess.*, 133: 169—176.
- Moniuszko-Jakoniuk J., Brz ska M.M. Patomechanisms of salubrious effects of lead exposure. *Polish J. Environ. Stud.*, 6 (Suppl): 38—43.
- Monsant A.C., Tang C., Baker A.J.M. 2008. The effect of nitrogen on rhizosphere soil pH and zinc phytoextraction by *Thalspi caerulescens*. *Chemosphere*, 73: 635—642.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. 2001a. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng. Geol.*, 60: 193—207.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. 2001b. An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. *J. Hazard. Mater.*, 85: 145—163.
- Muñoz-Rueda A., Gonzales-Murua C., Becerril J.M., Sánchez-Diaz M.F. 1986. Effects of glyphosate [*N*-(phosphonomethyl)glycine] on photosynthetic pigments, stomatal response and photosynthetic electron transport in *Megicago satiova* and *Trifolium pratense*. *Physiol. Plant.*, 66: 63—68.
- Nadg rska-Socha A., Łukasik I., CiepałR., Falis K. 2006. Wpływ EDTA na akumulację Cd, Zn, Pb przez *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 509: 197—207.

- Nascimento C.W.A., Amarasiriwardena D., Xing B. 2006. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 140: 114—123.
- Newman L.A., Reynolds C.M. 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15: 225—230.
- Nicolas B., Descotes J. 1996. Metals. In: *Human toxicology*. Ed. J. Descotes. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B.V., s. 515—540.
- Nigam R., Srivastava S., Prakash S., Srivastava M.M. 2001. Cadmium mobilisation and plant availability – the impact of organic acids commonly exuded from roots. *Plant Soil*, 230: 107—113.
- Nowack B., Schulin R., Robinson B.H. 2006. Critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 5225—5232.
- Ostrowska A., Gawlińska A., Szczubiałka Z. 1991. *Metody analizy i oceny gleby i roślin*. Warszawa, Wydawnictwo IOŚ, s. 325.
- Ouzounidou G., Ilias I. 2005. Hormone-induced protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity. *Biol. Plant.*, 49: 223—228.
- Palmgren M.G. 2001. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouse for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 817—845.
- Palowski B., Kimsa T., Sierka-Koper E., Ciepał R., Łukasik I. 2001. Concentration of zinc and lead in the soil around a non-ferrous smelter KGH „Bolesław” in Bukowno near Olkusz. *Acta Agrophys.*, 51: 143—150.
- Panfili F., Manceau A., Sarret G., Spadini L., Kirpichtchikova T., Bert V., Laboudigue A., Marcus M.A., Ahamdach N., Libert M-F. 2005. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69: 2265—2284.
- Pemadasa M.A. 1981. Abaxial and adaxial stomatal behaviour and responses to fusicoccin on isolated epidermis of *Commelina communis* L. *New Phytol.*, 89: 373—384.
- Pemadasa M.A. 1982. Differential abaxial and adaxial stomatal responses to indole-3-acetic acid in *Commelina communis* L. *New Phytol.*, 90: 209—219.
- Perfus-Barbeoch L., Leonhardg N., Vavasasseur A., Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.*, 32: 539—548.
- Peters W.S., Felle H. 1991. Control of apoplast pH in corn coleoptile segments. I: The endogenous regulation of cell wall pH. *J. Plant Physiol.*, 137: 655—661.
- Philippark K., Fuchs I., Lüthen H., Hoth S., Bauer C.S., Haga K., Thiel G., Ljung K., Sandberg G., Böttger M., Becker D., Hedrich R. 1999. Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12186—12191.
- Piechalak A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D., Malecka A. 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry*, 60: 153—162.

- Piechalak A., Tomaszewska B., Barańkiewicz D. 2003. Enhancing phytoremediation ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry*, 64: 1239—1251.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56: 15—39.
- Piotrowska-Seget Z., Cycoń M., Kozdrój J. 2005. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl. Soil Ecol.*, 28: 237—246.
- Pomponi M., Censi V., Di Girolamo V., De Paolis A., Sanita di Toppi L., Aromolo R., Costantino P., Cardarelli M. 2006. Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta*, 223: 180—190.
- Quartacci M.F., Irtelli B., Baker A.J.M., Navari-Izzo F. 2007. The use of NTA and EDDS for enhanced phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by *Brassica carinata*. *Chemosphere*, 68: 1920—1928.
- Quintero J.M., Fournier J.M., Benloch M. 2007. Na⁺ accumulation in shoot is related to water transport in K⁺-starved sunflower plants but not in plants with normal K⁺ status. *J. Plant Physiol.*, 164: 60—67.
- Rajasekaran K., Hein M.B., Vasil I.K. 1987. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Physiol.*, 84: 47—51.
- Raskin I., Smith R.D., Salt D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8: 221—226.
- Rausser W.E. 1987. Compartmental efflux analysis and removal of extracellular cadmium from roots. *Plant Physiol.*, 85: 62—65.
- Reddy K.N. 2000. Factors affecting toxicity, absorption, and translocation of glyphosate in redvine (*Brunnichia ovata*). *Weed Technol.*, 14: 457—462.
- Reeves R.D., Baker A.J.M. 2000. Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Eds. I. Raskin, B.D. Ensley. New York, USA, John Wiley & Sons, Inc., s. 193—229.
- Reeves R.D., Schwartz C., Morel J.L., Edmondson J. 2001. Distribution and metal-accumulating behaviour of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. *Int. J. Phytoremed.*, 3: 145—172.
- Reinhardt M., Gächter R., Wehrli B., Müller B. 2005. Phosphorus retention in small constructed wetlands treating agricultural drainage water. *J. Environ. Qual.*, 34: 1251—1259.
- Rieuwerts J.S., Farago M., Cikrt M., Benecko V. 1999. Heavy metal concentrations in and around households near a secondary lead smelter. *Environ. Monit. Assess.*, 58: 317—335.
- Rillig M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem process. *Ecol. Lett.*, 7: 740—754.
- Roberts J.A., Hussain A., Taylor I.B., Black C.R. 2002. Use of mutants to study long-distance signalling in response to compacted soil. *J. Exp. Bot.*, 53: 45—50.

- Roelfsema M.R.G., Hedrich R. 2005. In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate”. *New Phytol.*, 167: 665—691.
- Romanowska E., Igamberdiev A.U., Parys E., Gardeström P. 2002. Stimulation of respiration by Pb^{2+} in detached leaves and mitochondria of C_3 and C_4 plants. *Physiol. Plant.*, 116: 148—154.
- Römkens P., Bouwman L., Japenga J., Draisma C. 2002. Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environ. Pollut.*, 116: 109—121.
- Ross S.M. 1994a. Sources and forms of potentially toxic metals in soil — plant systems. In: *Toxic metals in soil-plant systems*. Ed. S.M. Ross. Chichester, England, John Wiley and Sons, Inc., s. 3—25.
- Ross S.M. 1994b. Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. In: *Toxic metals in soil-plant systems*. Ed. S.M. Ross. Chichester, England, John Wiley and Sons, Inc., s. 63—152.
- Ross S.M., Kaye J.K. 1994. The meaning of metal toxicity in soil-plant systems. In: *Toxic metals in soil-plant systems*. Ed. S.M. Ross. Chichester, England, John Wiley and Sons, Inc., s. 27—62.
- Rostański A. 1997. Rośliny naczyniowe terenów o wysokim stopniu skażenia metalami ciężkimi. *Acta Biol. Sil.*, 30 (47): 56—85.
- Rubio M.I., Escrig I., Martinez-Cortina C., López-Benet F.J., Sanz A. 1994. Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regul.*, 14: 151—157.
- Ruley A.T., Sharma N.C., Sahi S.V., Singh S.R., Sajwan K.S. 2006. Effect of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environ. Pollut.*, 144: 11—18.
- Sahi S.V., Bryant N.L., Sharma N.C., Singh S.R. 2002. Characterization of a lead hyperaccumulator *Sesbania drummondii*. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 4676—4680.
- Saifullah, Meers E., Qadir M., de Caritat P., Tack F.M.G., Du Laing G., Zia M.H. 2009. EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere*, 74: 1279—1291.
- Saifullah, Zia M.H., Meers E., Ghafoor A., Murtaza G., Sabir M., Zia-Ur-Rehman M., Tack F.M.G. 2010. Chemically enhanced phytoextraction of Pb by wheat in texturally different soils. *Chemosphere*, 79: 652—658.
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. 1995a. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology*, 13: 468—474.
- Salt D.E., Krämer U. 2000. Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. In: *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*. Eds. I. Raskin, B.D. Ensley. New York, USA, John Wiley & Sons, Inc., s. 231—246.

- Salt D.E., Pickering I.J., Prince R.C., Gleba D., Dushenkov S., Smith R.D., Raskin I. 1997. Metal accumulation by aquacultured seedlings of Indian mustard. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 1636—1644.
- Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J., Raskin I. 1995b. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.*, 109: 1427—1433.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 643—668.
- Sangi M.R., Shahmoradi A., Zolgharnein J., Azimi G.H., Ghorbandoost M. 2008. Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using *Ulmus carpinifolia* and *Fraxinus excelsior* tree leaves. *J. Hazard. Mater.*, 155: 513—522.
- Santos F.S., Hernández-Allica J., Becerril J.M., Amaral-Sobrinho N., Mazur N., Garbisu C. 2006. Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere*, 65: 43—50.
- Sarkar D., Andra S.S., Saminathan S.K.M., Datta R. 2008. Chelant-aided enhancement of lead mobilization in residential soils. *Environ. Pollut.*, 156: 1139—1148.
- Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazeman J.-L., Traverse A., Marcus M.A., Manceau A. 2002. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.*, 130: 1815—1826.
- Sarret G., Vangronsveld J., Manceau A., Musso M., d'Haen J., Menthonnex J.-J., Hazeman J.-L. 2001. Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 2854—2859.
- Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Małkowski E., Nowosielski O., Pogrzeba M. 2000. Zinc plant toxicity in process of lead and cadmium phytoextraction. *Ochrona Środ. Zasob. Nat.*, 20: 35—39.
- Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Małkowski E., Pogrzeba M., Kuperberg J.M., Kryński K. 2004. Phytoextraction crop disposal – an unsolved problem. *Environ. Pollut.*, 128: 373—379.
- Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Pogrzeba M., Małkowski E. 2008. Soil remediation scenarios for heavy metal contaminated soil. In: *Soil chemical pollution, risk assesment, remediation and security*. Eds. L. Simeonov, V. Sargsyan. The Netherlands, Springer, s. 313—319.
- Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Witschel M., Minkevich I.G., Eroshin V.K., Egli T. 2000. Degradation of metal-EDTA complexes by resting cells of the bacterial strain DSM 9103. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 1715—1720.
- Sawalha M.F., Peralta-Videa J.R., Sanchez-Salcido B., Gardea-Torresdey J.L. 2009. Sorption of hazardous metals from single and multi-element solutions by saltbush biomass in batch and continuous mode: Interference of calcium and magnesium in batch mode. *J. Environ. Manage.*, 90: 1213—1218.

- Sayed S.A. 1999. Effects of lead and kinetin on the growth, and some physiological components of safflower. *Plant Growth Regul.*, 29: 167—174.
- Schaidler L.A., Parker D.R., Sedlak D.L. 2006. Uptake of EDTA-complexed Pb, Cd and Fe by solution- and sand-cultured *Brassica juncea*. *Plant Soil*, 286: 377—391.
- Scheckel K.G., Ryan J.A. 2004. Spectroscopic speciation and quantification of lead in phosphate-amended soils. *J. Environ. Qual.*, 33: 1288—1295.
- Schmidt U. 2003. Enhancing phytoextraction: the effect of chemical manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *J. Environ. Qual.*, 32: 1939—1954.
- Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. 1999. Apolastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.*, 50: 1267—1280.
- Schultz M.E., Burnside O.C. 1980. Absorption, translocation, and metabolism of 2,4-D and glyphosate in hemp dogbane (*Apocynum cannabinum*). *Weed Sci.*, 28: 13—20.
- Schwartz C., Echevarria G., Morel J.L. 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil*, 249: 27—35.
- Schwartz C., Sirguy C., Peronny S., Reeves R.D., Bourgaud F., Morel J.L. 2006. Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. *Int. J. Phytoremed.*, 8: 339—357.
- Scott I.M. 1992. Fusicoccin-induced changes in the translatable RNAs of etiolated pea stem tissue. *J. Exp. Bot.*, 43: 1361—1365.
- Sekhar K.C., Kamala C.T., Chary N.S., Balaram V., Garcia G. 2005. Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere*, 58: 507—514.
- Servaites J.C., Tucci M.A., Geiger D.R. 1987. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. *Plant Physiol.*, 85: 370—374.
- Sękara A., Poniedziałek M., Ciura J., Jędrzczyk E. 2005. Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. *Polish J. Environ. Stud.*, 14: 509—516.
- Shaner D.L. 1978. Effects of glyphosate on transpiration. *Weed Sci.*, 26: 513—516.
- Shaner D.L., Lyon J.L. 1980. Interaction of glyphosate with aromatic acids on transpiration in *Phaseolus vulgaris*. *Weed Sci.*, 28: 31—35.
- Shen Z.G., Zhao F.J., McGrath S.P. 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant, Cell Environ.*, 20: 898—906.
- Shibata M., Konno T., Akaike R., Xu Y., Shen R., Ma J.F. 2007. Phytoremediation of Pb contaminated soil with polymer-coated EDTA. *Plant Soil*, 290: 201—208.
- Shieh W.-J., Geiger D.R., Servaites J.C. 1991. Effect of *N*-(Phosphonomethyl)glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. *Plant Physiol.*, 97: 1109—1114.
- Shishova M., Lindberg S. 2004. Auxin induces an increase of Ca²⁺ concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts. *J. Plant Physiol.*, 161: 937—945.

- Sidoli O'Connor C., Lepp N.W., Edwards R., Sunderland G. 2003. The combined use of electrokinetic remediation and phytoremediation to decontaminate metal-polluted soils: a laboratory-scale feasibility study. *Environ. Monit. Assess.*, 84: 141—158.
- Šimonová E., Henselová M., Masarovičová E., Kohanová J. 2007. Comparison of tolerance of *Brassica juncea* and *Vigna radiata* to cadmium. *Biol. Plant.*, 51: 488—492.
- Sirguey C., Schwartz C., Morel J.L. 2006. Response of *Thlaspi caerulescens* to nitrogen, phosphorus and sulfur fertilization. *Int. J. Phytoremed.*, 8: 149—161.
- Sondergaard T.E., Schulz A., Palmgren M.G. 2004. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.*, 136: 2475—2482.
- Song X.G., She X.P., He J.M., Huang C., Song T.S. 2006. Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening involves a decrease in levels of hydrogen peroxide in guard cells of *Vicia faba*. *Func. Plant Biol.*, 33: 573—583.
- Sprankle P., Meggitt W.F., Penner D. 1975. Absorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Sci.*, 23: 235—240.
- Squire G.R., Mansfield T.A. 1974. The action of fusicoccin on stomatal guard cells and subsidiary cells. *New Phytol.*, 73: 433—440.
- Starck Z. 2002. Pobieranie i dystrybucja jonów. W: *Fizjologia roślin*. Red. J. Kopewicz, S. Lewak. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 259—271.
- Stibon F., Perrot-Rechenmann C. 1997. Expression of auxin-regulated genes. *Physiol. Plant.*, 100: 443—455.
- Straczek A., Sarret G., Manceau A., Hinsinger P., Geoffroy N., Jaillard B. 2008. Zinc distribution in roots of various genotypes of tobacco exposed to Zn. *Environ. Exp. Bot.*, 63: 80—90.
- Sun Q., Wang X.R., Ding S.M., Yuan X.F. 2005. Effects of exogenous organic chelators on phytochelatin production and its relationship with cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium stress. *Chemosphere*, 60: 22—31.
- Sunkar R., Kaplan B., Bouché N., Arazi T., Dolev D., Talke I.N., Maathuis F.J., Sanders D., Bouchez D., Fromm H. 2000. Expression of a truncated tobacco *NtCBP4* channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb²⁺ tolerance. *Plant J.*, 24: 533—542.
- Száková J., Tlustoš P., Pavlíková D., Hanč A., Batysta M. 2007. Effect of addition of ameliorative materials on the distribution of As, Cd, Pb, and Zn in extractable soil fractions. *Chem. Pap.*, 61: 276—281.
- Szarek-Łukaszewska G., Niklińska M. 2002. Concentration of alkaline and heavy metals in *Biscutella leavigata* L. and *Plantago lanceolata* L. growing on calamine spoils (S. Poland). *Acta Biol. Cracov., Bot.*, 44: 29—38.
- Tanner C.C., D'Eugenio J., McBride G.B., Sukias J.P.S., Thompson K. 1999. Effect of water level fluctuation on nitrogen removal from constructed wetland mesocosms. *Ecol. Eng.*, 12: 67—92.

- Tanton T.W., Crowdy S.H. 1971. The distribution of lead chelate in the transpiration stream of higher plants. *Pestic. Sci.*, 2: 211—213.
- Tassi E., Pouget J., Petruzzelli G., Barbafieri M. 2008. The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, 71: 66—73.
- Terelak H., Stuczyński T., Motwicka-Terelak T., Piotrowska M. 1997a. Zawartość Cd, Cu, Ni, Pb, Zn i S w glebach województwa katowickiego i Polski. *Arch. Ochr. Środ.*, 23 (3—4): 167—180.
- Terelak H., Stuczyński T., Piotrowska M. 1997b. Heavy metals in agricultural soils in Poland. *Pol. J. Soil Sci.*, 30 (2): 35—42.
- Thayalakumaran T., Robinson B.H., Vogeler I., Scotter D.R., Clothier B.E., Percival H.J. 2003. Plant uptake and leaching of copper during EDTA-enhanced phytoremediation of repacked and undisturbed soil. *Plant Soil*, 254: 415—423.
- Theodoratos P., Papassiopi N., Xenidis A. 2002. Evaluation of mono-basic calcium phosphate for the immobilization of heavy metals in contaminated soils from Lavrion. *J. Hazard. Mater.*, B94: 135—146.
- Theologis A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37: 407—438.
- Thiel G., Weise R. 1999. Auxin augments conductance of K⁺ inward rectifier in maize coleoptile protoplasts. *Planta*, 208: 38—45.
- Tilquin M., Peltier J.P., Marigo G. 2000. Mechanisms for the coupling of iron and glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 67: 145—154.
- Toméf V., Rodriguez P.B., Lozano J.C. 2008. Elimination of natural uranium and ²²⁶Ra from contaminated waters by rhizofiltration using *Helianthus annuus* L. *Sci. Total Environ.*, 393: 351—357.
- Tudoreanu L., Phillips C.J.C. 2004. Modelling cadmium uptake and accumulation in plants. *Adv. Agronom.*, 84: 121—157.
- Tung G., Temple P.J. 1996. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *Sci. Total Environ.*, 188: 71—85.
- Turgut C., Pepe M.K., Cutright T.J. 2005. The effect of EDTA on *Helianthus annuus* uptake, selectivity, and translocation of heavy metals when grown in Ohio, New Mexico and Colombia soils. *Chemosphere*, 58: 1087—1095.
- Upadhyay A.R., Tripathi B.D. 2007. Principle and process of biofiltration of Cd, Cr, Co, Ni and Pb from tropical opencast coalmine effluent. *Water Air Soil Pollut.*, 180: 213—223.
- Van Belleghem F., Cuypers A., Semane B., Smeets K., Vangronsveld J., d'Hean J., Valcke R. 2007. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 173: 495—508.
- Van Ieperen W., van Meeteren U., van Gelder H. 2000. Fluid ionic composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. *J. Exp. Bot.*, 51: 769—776.
- Vangronsveld J., Colpaert J.V., Van Tichelen K.K. 1996. Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physicochemical

- and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. *Environ. Pollut.*, 94: 131—140.
- Vangronsveld J., Cunningham S.D. 1998. Introduction to the concepts. In: *Metal-contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation*. Eds. J. Vangronsveld, S.D. Cunningham. Berlin, Germany, Springer Verlag, s. 1—15.
- Vangronsveld J., Van Ashe F., Clijsters H. 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: *in situ* metal immobilization and revegetation. *Environ. Pollut.*, 87: 51—59.
- Vassil A.D., Kapulnik Y., Raskin I., Salt D.E. 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiol.*, 117: 447—453.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.*, 181: 759—776.
- Verkleij J.A.C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D.M., Schwitzguébel J.-P., Schröder P. 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environ. Exp. Bot.*, 67: 10—22.
- Véry A.A., Sentenac H. 2003. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 575—603.
- Vodnik D., Jentschke G., Fritz E., Gogala N., Godbold D.L. 1999. Root-applied cytokinin reduces lead uptake and affects its distribution in Norway spruce seedlings. *Physiol. Plant.*, 106: 75—81.
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environ. Pollut.*, 139: 362—371.
- Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Timergalina L.N., Dedov A.V., Veselov S.Y., Kudoyarova G.R. 2004. Effect of partial root excision on transpiration, root hydraulic conductance and leaf growth in wheat seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 42: 251—255.
- Wakabayashi K., Böger P. 2004. Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 2): amino acid, lipid and cell wall biosynthesis, and other targets for future herbicides. *Weed Biol. Manag.*, 4: 59—70.
- Walker D.J., Clemente R., Roig A., Bernal M.P. 2003. The effects of soil amendments on heavy metal bioavailability in two contaminated Mediterranean soils. *Environ. Pollut.*, 122: 303—312.
- Wang H.H., Shan X.Q., Wen B., Owens G., Fang J., Zhang S.Z. 2007. Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. *Environ. Exp. Bot.*, 61: 246—253.
- Wasay S.A., Barrington S.F., Tokunaga S. 1998. Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. *Environ. Technol.*, 19: 369—380.
- Wasinkiewicz K., Wojtera J., Tomaszewska B. 2004. Transformowanie roślin w celu ich wykorzystania w fitoremediacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi. *Biotechnologia*, 64 (1): 108—126.

- Watanabe H., Takahashi K. 1997. Effects of abscisic acid, fusaric acid, and potassium on growth and morphogenesis of leaves and internodes in dark-grown rice seedlings. *Plant Growth Regul.*, 21: 109—114.
- Wawrzyński A., Kopera E., Wawrzyńska A., Kamińska J., Bal W., Sirko A. 2006. Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants. *J. Exp. Bot.*, 57: 2173—2182.
- Welch R.M., Norvell W.A. 1999. Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. In: *Cadmium in soils and plants*. Eds. M.J. McLoughlin, B.R. Singh. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, s. 125—150.
- Wenzel W.W., Unterbrunner R., Sommer P., Sacco P. 2003. Chelator-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant Soil*, 249: 83—96.
- White P.J. 2001. The pathways of calcium movement to the xylem. *J. Exp. Bot.*, 52: 891—899.
- Wierzbicka M. 1987a. Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots. *Can. J. Bot.*, 65: 1851—1860.
- Wierzbicka M. 1987b. Lead accumulation and its translocation barriers in roots of *Allium cepa* L. – autoradiographic and ultrastructural studies. *Plant, Cell Environ.*, 10: 17—26.
- Wierzbicka M. 1999. The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L. *Protoplasma*, 207: 186—194.
- Wierzbicka M., Rostański A. 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biol. Cracov., Bot.*, 44: 7—19.
- Wilde E.W., Brigmon R.L., Dunn D.L., Heitkamp M.A., Dagnan D.C. 2005. Phytoextraction of lead from firing range soil by Vetiver grass. *Chemosphere*, 61: 1451—1457.
- Wojas S., Clemens S., Henning J., Skłodowska A., Kopera E., Schat H., Bal W., Antosiewicz D.M. 2008. Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium. *J. Exp. Bot.*, 59: 2205—2219.
- Wojas S., Ruszczyńska A., Bulska E., Wojciechowska M., Antosiewicz D.M. 2007. Ca^{2+} -dependent plant response to Pb^{2+} is regulated by *LCT1*. *Environ. Pollut.*, 147: 584—592.
- Woźny A., Schneider J., Gwóźdź E.A. 1995. The effects of lead and kintin on greening barley leaves. *Biol. Plant.*, 37: 541—552.
- Wójcik M., Tukiendorf A. 1999. The effect of EDTA on maize seedlings response to Cd-induced stress. *Z. Naturforsch.*, 54c: 754—758.
- Wójcik M., Tukiendorf A. 2004. Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.*, 44: 71—80.
- Wójcik M., Tukiendorf A. 2005. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biol. Plant.*, 49: 237—245.
- Wójcik P., Tomaszewska B. 2005. Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych. *Biotechnologia*, 71 (4): 156—172.

- Wu J., Hsu F.C., Cunningham S.D. 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 1898—1904.
- Wu L.H., Lou Y.M., Christie P., Wong M.H. 2003. Effect of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of heavy metal polluted soil. *Chemosphere*, 50: 819—822.
- Wu L.H., Lou Y.M., Xing X.R., Christie P. 2004. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 102: 307—318.
- Wyszkowska J., Wyszkowski M. 2002. Effect of cadmium and magnesium on microbiological activity in soil. *Polish J. Environ. Stud.*, 11: 585—591.
- Xie H.L., Jiang R.F., Zhang F.S., McGrath S.P., Zhao F.J. 2009. Effect of nitrogen form on the rhizosphere dynamics and uptake of cadmium and zinc by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil*, 318: 205—215.
- Xu Y., Yamaji N., Shen R., Ma J.F. 2007. Sorghum roots are inefficient in uptake of EDTA-chelated lead. *Ann. Bot.*, 99: 869—875.
- Yan X.L., Chen T.B., Liao X.Y., Huang Z.C., Pan J.R., Hu T.D., Nie C.J., Xie H. 2008. Arsenic transformation and volatilization during incineration of the hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 1479—1484.
- Yang B., Lan C.Y., Yang C.S., Liao W.B., Chang H., Shu W.S. 2006. Long-term efficiency and stability of wetlands for treating wastewater of a lead/zinc mine and the concurrent ecosystem development. *Environ. Pollut.*, 143: 499—512.
- Yu W., Zhang R., Li R., Guo S. 2007. Isolation and characterization of glyphosate-regulated genes in soybean seedlings. *Plant Sci.*, 172: 497—504.
- Zaina S., Breviario D., Mapelli S., Bertani A., Reggiani R. 1994. Two putative G-protein α subunits dissociate from rice coleoptile membranes after GTP stimulation. *J. Plant Physiol.*, 143: 293—297.
- Zaurov D.E., Perdomo P., Raskin I. 1999. Optimizing soil fertility and pH to maximize cadmium removed by Indian mustard from contaminated soils. *J. Plant Nutr.*, 22: 977—986.
- Zeiger E. 1983. The biology of stomatal guard cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 34: 441—475.
- Zeng Q.R., Sauvé S., Allen H.E., Hendershot W.H. 2005. Recycling EDTA solutions used to remediate metal-polluted soils. *Environ. Pollut.*, 133: 225—231.
- Zhuang P., Ye Z.H., Lan C.Y., Xie Z.W., Shu W.S. 2005. Chemically assisted phytoextraction of heavy metal contaminated soils using three plant species. *Plant Soil*, 276: 153—162.
- Zimmermann H.M., Hartmann K., Schreiber L., Steudle E. 2000. Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta*, 210: 302—311.
- Zwieniecki M.A., Melcher P.J., Holbrook N.M. 2001. Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science*, 291: 1059—1062.

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

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



Cena 16 zł
+ (VAT)

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-226-2020-5