



Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych

Przemysław Wójcik, Barbara Tomaszewska

Zakład Biochemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Biotechnology in remediation of organic contamination

Summary

Extensive industrial and agricultural development of the 20th century is one of the causes of wide-spread contamination of the environment by organic pollutants such as polyaromatic hydrocarbons, pesticides and explosive compounds. Nowadays, apart from traditional remediation techniques involving mechanical treatment, we are facing new opportunities of utilizing microorganisms (bioremediation) and plants (phytoremediation) to contain, transform or remove toxic elements present in soils, water and, to some point, in atmosphere. Great diversity of living organisms and application of genetic engineering make bio- and phytoremediation even more attractive.

Key words:

bioremediation, phytoremediation, transgenic plants, polyaromatic hydrocarbons, CYP450.

1. Wstęp

Postęp techniczny związany z rozwojem przemysłu i urbanizacją jest nierozdzielnie związany z wytwarzaniem wielu użytecznych chemikaliów, które po wykorzystaniu w postaci niezmiennych lub po przekształceniu w inne związki ulegają akumulacji w glebie, wodzie i powietrzu. Stopień akumulacji związków toksycznych jest szybszy niż działania człowieka podjęte by je zlikwidować i w związku z tym coraz więcej uwagi poświęca się na efektywne wykorzystanie zasobów samej natury w celu zmniejszenia jej zanieczyszczenia. Dzięki odkryciom naukowym z dziedziny fizjologii i biochemii doszło do opracowania podstaw biotechnologii środowiskowej znanej powszechnie jako bioremediacja i fitoremediacja.

Adres do korespondencji

Przemysław Wójcik,
Zakład Biochemii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań.

biotechnologia

4 (71) 156-172 2005

Bioremediacja to możliwość wykorzystania w celu oczyszczania środowiska mikroorganizmów, które dzięki dużym zdolnościom degradacji związków chemicznych i możliwościami transformacji są skutecznie wykorzystywane w oczyszczaniu gleby, a także wody (w oczyszczalniach ścieków).

Wykorzystanie roślinnych mechanizmów obronnych i zdolności metabolizowania związków toksycznych leży u podłoża fitoremediacji. W technologii tej rośliny można potraktować jako złożony mechanizm napędzany energią słoneczną zdolny do oczyszczania gleby, wody i powietrza z zanieczyszczeń, którymi mogą być zarówno metale ciężkie, związki organiczne jak i gazy (1).

Usuwanie zanieczyszczeń organicznych opiera się zaś głównie na biodegradacji, fitodegradacji i fitowolatyzacji, przy czym głównym problemem jest pobranie często lipofilnych i związanych z komponentami gleby ksenobiotyków (2).

2. Najczęściej spotykane zanieczyszczenia organiczne

Najczęściej występującymi w środowisku zanieczyszczeniami organicznymi są monoaromatyczne węglowodory (BTEX) oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz ich pochodne.

2.1. Węglowodory aromatyczne

BTEX (benzen, toluen, etylobenzen i ksyleny) powszechnie występują w ropie naftowej i jej pochodnych. Są one również produkowane przez człowieka na użytek przemysłu jako rozpuszczalniki i substraty do produkcji pestycydów, tworzyw sztucznych i włókien syntetycznych. Związki te uważane są za jedno z głównych źródeł zanieczyszczenia w związku z częstymi wyciekami i nieszczelnością cystern, czy też urządzeń dystrybucyjnych i rafinerijnych (3). Zanieczyszczenia wód gruntowych związkami BTEX trudno ulegają remediacji w związku z relatywnie dużą ich rozpuszczalnością i gwałtownym rozprzestrzenieniem w środowisku wodnym.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to jedne z najbardziej toksycznych organicznych zanieczyszczeń środowiska. Przyczyną ich powstawania są zarówno procesy zachodzące w naturze, takie jak pożary lasów oraz wybuchy wulkaniczne, jak i działalność człowieka związana z przemysłem, komunikacją, spalaniem odpadów miejskich. WWA powstałe na skutek spalania nie pozostają jednak w atmosferze, lecz jako opady dostają się do gleby. Niektóre z WWA są celowo produkowane przez człowieka, np. jako składniki preparatów ochrony drewna (4). Za WWA uważane są organiczne związki chemiczne składające się z dwóch lub więcej pierścieni benzenowych. Cechują się one dużymi masami cząsteczkowymi oraz małą rozpuszczalnością w wodzie, co wynika z ich dużej lipofilności. Wartości logarytmu współczynnika podziału oktanol-woda ($\log K_{ow}$) wahają się dla nich w zakresie od

3 do 7 (5,6). WWA o wartości $\log K_{ow}$ równej 4 lub mniejszej (naftalen, fenantren) są zdolne do przejścia przez błony komórkowe do lipofilnych kompartmentów wewnątrz komórek, co wpływa na ich dostępność do korzeni roślin. WWA o większych wartościach $\log K_{ow}$ preferencyjnie przechodzą do frakcji humusu w glebie lub sedymentują i ulegają absorpcji przez osad denny w środowiskach wodnych (5). Cechy te ograniczają biodostępność WWA, a przez to i ich remediację (5,6), która zależy od właściwości samego związku jak i środowiska, w którym się on znajduje. Im większa masa cząsteczkowa danego związku, a także im więcej pierścieni benzenu zawiera tym wolniej zachodzi jego rozkład (4).

2.2. Pochodne węglowodorów

Alkoholowe i aminowe pochodne benzenu to **fenole i aniliny**. Obie grupy związków są rozpuszczalne zarówno w polarnych jak i niepolarnych rozpuszczalnikach. Podobnie jak WWA również fenole i aniliny mogą być wiązane przez humus, co ma wpływ na ich biodostępność. Dodatkowo związki te w różnych wartościach pH mogą tworzyć jony (aniliny w neutralnym pH uzyskują ładunek dodatni, zaś fenole w środowisku alkalicznym ładunek ujemny). Właściwość ta w znaczącym stopniu wpływa na ich potencjał pobrania przez rośliny (5). Aniliny i ich azotowe pochodne wykorzystywane są w przemyśle jako substraty do syntezy barwników oraz jako antyoksydanty w przemyśle gumowym. W środowisku często przechodzą w aminy o właściwościach karcenogennych (5).

Naturalne **związki nitroaromatyczne** (chloramfenikol i inne) rzadko występują w naturze, co tłumaczy ich niezwykłą odporność na biodegradację. Do produkowanych przez człowieka na skalę masową związków nitroaromatycznych zalicza się m.in. nitrobenzen, *o*- i *p*-nitrotoluen, 2,4-dinitrotoluen używane do produkcji pianek poliuretanowych, herbicydów, insektycydów, farmaceutyków, materiałów wybuchowych. Do tych ostatnich należy najszerzej rozpowszechniony trinitrotoluen (TNT), który w związku z obecnością symetrycznie rozłożonych grup nitrowych jest niezwykle odporny na działanie dioksygenaz, enzymów uczestniczących w degradacji przez mikroorganizmy również innych aromatycznych węglowodorów (8).

Kolejną grupę pochodnych węglowodorów stanowią **chlorowcopochodne** stosowane jako pestycydy. Stanowią one poważne zagrożenie dla środowiska, gdyż są w dużym stopniu odporne na degradację, a także znane są z akumulacji w tkankach zwierząt. Z tego powodu wiele z nich znalazło się na liście trwałych organicznych zanieczyszczeń i zakazano ich stosowania (m.in. *p,p'*-dichlorodifenylotrichloroetan [DDT]). Inne chlorowcopochodne związki znajdujące zastosowanie jako herbicydy i insektycydy, składniki farb, atramentów, kosmetyków, środków dezynfekujących i czyszczących to m.in. trichloroetylen (TCE) oraz pentachlorofenol (PCP) (5,9).

Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (USEPA), Parlament i Rada Europy jak i polskie instytucje (m.in. Ministerstwo Środowiska, Ministerstwo Rolnictwa i Roz-

woju Wsi) ustalają standardy jakości gleby i wód oraz wydają odpowiednie dyrektywy i rozporządzenia regulujące produkcję i stosowanie wielu wspomnianych związków organicznych. Instytucje te do najbardziej toksycznych zanieczyszczeń organicznych zaliczyły m.in. naftalen, antracen, fenantren, fluoranten, piren, benzo[α]pirren, pentachlorobenzen, pentachlorofenol. Stosowanie tego ostatniego w środkach ochrony roślin jest obecnie zabronione, zaś w 2008 r. ma wejść w życie całkowity zakaz stosowania PCP (10,11).

3. Remediacja

Wniknięcie organicznych zanieczyszczeń do komórek wywołuje szereg zmian w ich metabolizmie. Dzieje się tak, gdyż detoksykacja wymaga mobilizacji komórki i nastawienia całego jej potencjału energetycznego oraz metabolitecznego na degradację ksenobiotyku. Pierwszym etapem degradacji jest indukcja syntezy i aktywowanie systemów enzymatycznych bezpośrednio uczestniczących w detoksykacji. Enzymatyczne mechanizmy degradacji WWA są przedmiotem badań naukowców od wielu lat. Już w roku 1964 prowadzono badania nad szlakiem katabolizmu naftalenu (12), zaś obecne odkrycia znacznie poszerzyły tę wiedzę (13).

Do głównych enzymów uczestniczących w obróbce ksenobiotyków należą m.in. dioksygenazy, peroksydazy, monoooksygenazy oraz oksydazy. Efektem ich działania jest przeprowadzenie lipofilnego związku toksycznego w formę bardziej dostępną (często z otwartym pierścieniem aromatycznym) dla dalszych etapów remediacji. To właśnie dzięki tym enzymom i przemianom przez nie katalizowanym mikroorganizmy zdolne są uzyskać energię oraz substraty do syntezy białek komórkowych z węglowodorów aromatycznych, przeprowadzając równocześnie mineralizację związków toksycznych do CO₂ poprzez szlak kwasów trikarboksylowych (TCA) (5).

Należy zwrócić uwagę, że część enzymów uczestniczących w remediacji może spełniać swoją rolę po wydzieleniu do gleby i katalizować reakcje zmieniające właściwości związków organicznych nawet po śmierci mikroorganizmu lub rośliny (14).

3.1. Mechanizmy zaangażowane w utlenianie zanieczyszczeń organicznych

3.1.1. Dioksygenazy

W dość dobrze poznanej degradacji naftalenu, która inicjowana jest poprzez wprowadzenie dwóch atomów tlenu w cząsteczkę węglowodoru aromatycznego uczestniczy multienzymatyczny kompleks dioksygenazy, na który składa się reduktaza, ferredoksyna i proteiny siarkowo-żelazowe. Na tym etapie powstają cząsteczki dihydrodioli, które pod wpływem dehydrogenaz ulegają następnie przekształceniu

w katechole. Dzięki rozszczepieniu katecholi możliwe jest otwarcie pierścienia aromatycznego z wytworzeniem kwasu pirogronowego, bursztynowego, fumarowego lub octowego, które mogą zostać włączone w cykl kwasów trikarboksylowych (13,15).

Enzymy zaangażowane w degradację naftalenu wykazują również zdolność degradacji fenantrenu oraz antracenu. Ponadto dioksygenazy biorą udział w degradacji innych związków aromatycznych (na różnych etapach) w tym bifenyli, ksylenów, chlorowcopochodnych, fenoli i anilin (4,16,17).

3.1.2. Peroksydazy

Izoenzymy peroksydaz występują w ścianie komórkowej, plazmalemmie, cytoplazmie, a także w powiązaniu z wewnętrznym systemem błon. Ta hemoproteina zawiera w swojej strukturze węglowodany (około 25% całkowitej masy), które chronią enzym przed degradacją proteolityczną (18).

Enzym ten charakteryzuje się niską specyficznością oraz wysokim powinowactwem do ksenobiotyków różnego rodzaju, co wraz z szerokim rozpowszechnieniem peroksydaz w komórce umożliwia tym enzymom utlenienie całego spektrum obcych związków i udział w szeregu procesach detoksykacji.

W warunkach stresowych następuje wzrost aktywności peroksydazy. Peroksydaza odgrywa dużą rolę w ochronie komórek roślinnych przed cząsteczkami H_2O_2 powstającymi w reakcjach oksydacyjnych podczas fotosyntezy poprzez wykorzystanie H_2O_2 jako utleniacza. Grupa hemowa jest miejscem, w którym H_2O_2 zostaje zredukowane do H_2O , dzięki przeniesieniu elektronów z substratu na grupę hemową. Ponadto peroksydazy przeprowadzają oksydację fenoli i anilin do nietoksycznych polimerycznych produktów włączanych w strukturę ścian komórkowych, co wiąże się z syntezą lignin. Włączenie tych nietoksycznych form fenoli i anilin w skład lignin jest końcowym aktem fitostabilizacji tych związków.

Niektóre rośliny są w stanie wydzielać znaczne ilości peroksydaz do ryzosfery, gdzie mogą one uczestniczyć w oksydacyjnej degradacji związków występujących w glebie, a także w reakcjach polimeryzacji prowadzących do immobilizacji zanieczyszczeń w ryzosferze. Peroksydazy roślinne wykazują uderzające podobieństwo do peroksydaz izolowanych z grzybów. Grupa hemowa peroksydaz grzybów jest jednak niedostępna, co powoduje, że przeprowadzają one reakcję rozkładu lignin w odróżnieniu od peroksydaz roślinnych, które posiadając wyeksponowaną grupę hemową przeprowadzają proces tworzenia lignin (19).

Pochodzące z grzybów peroksydazy takie jak MnP (Mn-peroksydaza), LIP (peroksydaza ligninowa) używają jonów Mn^{2+} jako katalizatorów w procesie degradacji lignin, związków humusowych jak i aromatycznych ksenobiotyków takich jak fenantren, piren, benzo[α]piren poprzez hydroksylację, oksydację i cięcie struktur pierścienia aromatycznego. Zapewnienie różnorodności degradowanych substratów wy-

nika prawdopodobnie z istnienia różnych izoform tych enzymów. Istnieje około 10 genów dla LIP (lipa-lipJ) oraz kilka dla MnP (mnp-1,2,3) (20).

Peroksydazy grzybów, a przede wszystkim LIP, są przedmiotem zainteresowania pod względem możliwości ich wykorzystania w strategiach bioremediacji, gdyż dzięki zastosowaniu pośredników w reakcjach redoks katalityczne zdolności LIP mogą zostać poszerzone, co umożliwiłoby oksydację nie tylko ligninu, ale i dużych polimerów aromatycznych, takich jak WWA o dużych masach cząsteczkowych. Ponadto LIP jest zdolna katalizować dehalogenację chlorowcopochodnych (19).

3.1.3. Cytochrom P450 i system monoooksygenaz

Rośliny wyposażone są w system cytochromów P450 występujących zarówno w postaci rozpuszczonej w cytoplazmie jak i w powiązaniu z błonami komórkowymi, co w znacznym stopniu zwiększa zdolność roślin do detoksykacji.

Cytochromy P450 to monoooksygenazy zawierające hem jako grupę prostetyczną. Zaangażowane są one w metabolizowanie wielu związków zarówno endogennych jak i egzogennych. Katalizują one ponad 20 reakcji biosyntezy (m.in. hormonów i lipidów) w komórkach roślinnych (18). Po wniknięciu ksenobiotyków do komórki następuje spadek aktywności reakcji biosyntezy prowadzonych przez CYP450 na rzecz reakcji hydroksylacji ksenobiotyków, w takim stopniu, że około 80% cytochromów P450 zaangażowanych jest w detoksykację. Przejście między tymi dwoma aktywnościami wywołane jest przez wyższe powinowactwo ksenobiotyków niż naturalnych substratów do cytochromów. Zmianie aktywności cytochromów towarzyszy również indukcja monoooksygenaz, peroksydaz i fenoloooksydaz (19).

Cytochromy P450 zużywają w przeprowadzanych przez siebie reakcjach elektronów pochodzące z NADPH w celu aktywowania tlenu cząsteczkowego i włączenia pojedynczego atomu tlenu w cząsteczkę substratu. Podczas detoksykacji katalizują one głównie reakcje hydroksylacji i epoksydacji pierścieni fenolowych, a także reduktywną dehalogenację. Nie wykazano, jak dotąd by katalizowały one otwarcie pierścienia aromatycznego (5).

Harvey (5) podaje, że dla oczyszczonych frakcji CYP450 pierwszymi udokumentowanymi reakcjami metabolizowania ksenobiotyków były reakcje dealkilacji metyloamin. Znane jest również zaangażowanie CYP450 w metabolizm zanieczyszczeń poliaromatycznych i polichlorowcopochodnych w organizmach zwierząt (21,22). W przypadku roślin dobrze udokumentowano zaangażowanie CYP450 w metabolizm herbicydów. Dokumentacje na temat zaangażowania CYP450 w metabolizm innych przemysłowych zanieczyszczeń aromatycznych są jednak nikle.

W ostatnich latach wyodrębniono, sklonowano i uzyskano po raz pierwszy nadekspresję niektórych genów CYP450 zaangażowanych w metabolizm naturalnych pochodnych fenolu, takich jak np. kwas cynamonowy. Dostarczyło to narzędzi do

badania zdolności roślinnych CYP450 do metabolizowania ksenobiotyków, jak i warunków redoks niezbędnych dla tych reakcji.

Dzięki badaniom różnorodności rodziny CYP450 wykazano m.in. istnienie 272 genów CYP450 u *Arabidopsis thaliana*, co czyni z tych enzymów największą rodzinę białek enzymatycznych u roślin wyższych (23). Dzięki temu możliwe jest obecnie konstruowanie zrekombinowanych enzymów roślinnych w celu systematycznego badania metabolizmu dowolnych zanieczyszczeń organicznych.

3.1.4. Fenoloksydaza

Fenoloksydaza to proteina zlokalizowana w chloroplastach roślin wyższych zawierająca w swojej cząsteczce atom miedzi. Enzym ten katalizuje reakcje monooksygenacji jak i oksygenacji. Fenoloksydaza uczestniczy w oksydacji ksenobiotyków wykorzystując obie swoje aktywności. Aromatyczne ksenobiotyki poddawane są dzięki temu enzymowi reakcjom oksydacji, hydroksylacji i dalszego utleniania aż do wytworzenia chinonów (18).

3.2. Sprzężenie zanieczyszczeń z substratami endogennymi

U roślin wyższych często spotykanym enzymatycznym procesem detoksykacji jest sprzężenie ksenobiotyków poprzez grupy hydroksylowe, karboksylowe i aminowe z endogennymi związkami takimi jak: węglowodany, aminokwasy i peptydy z wytworzeniem wiązań estrowych, eterowych i peptydowych.

Dzięki takiej obróbce następuje zmniejszenie toksyczności ksenobiotyków dla rośliny, a także zwiększenie ich hydrofilowości, a to z kolei zwiększa ich mobilność i ułatwia deponowanie w wakuoli lub w innych przedziałach komórki.

Opisane mechanizmy uczestniczące w oksydacji związków organicznych często mogą stanowić etap wstępny (enzymatyczna oksydacja, redukcja i hydroksylacja) dla reakcji sprzężania poprzez wbudowywanie grup funkcyjnych niezbędnych do zajścia tych procesów.

Sprzężenie z endogennymi substratami może być ostatnim etapem fitostabilizacji, czego przykładem jest deponowanie pochodnych fenoli i anilin w ścianie komórkowej jako składników lignin. Czasem jednak po wejściu do łańcucha pokarmowego koniugaty takie mogą dysocjować z uwolnieniem substancji toksycznych. W takich przypadkach sprzężenie należy uznać za przejściowy etap transformacji ksenobiotyku (18).

Produkty sprzężenia mogą ulegać dalszej oksydacji, której ostatecznym efektem jest całkowita mineralizacja do dwutlenku węgla dzięki rozerwaniu struktury pierścienia aromatycznego i włączeniu prostszych węglowodorów w cykl kwasów trikarboksylowych. W rezultacie rozległej oksydacji wszystkie atomy węgla zawarte w związku toksycznym mogą zostać włączone w szlaki obiegu węgla w komórce (18).

3.2.1. Glikozylacja

Glikozylacja polega na przyłączeniu reszt cukrowych do cząsteczki substratu, dzięki obecności w nim grup hydroksylowych i aminowych. Głównymi enzymami przeprowadzającymi proces glikozylacji są UDP-zależne glikozylotransferazy. Większość glikozylotransferaz rozpuszczalna jest w cytozolu, ale możliwe jest ich powiązanie z błonami komórkowymi.

W warunkach naturalnych glikozylotransferazy przeprowadzają reakcje glikozylacji cząsteczek sygnałnych, prekursorów biosyntezy oraz czynników obronnych. Zdolne są one również do przeprowadzania reakcji glikozylacji fenoli, anilin jak i chlorowcopochodnych węglowodorów takich jak pestycydy. Do grup aminowych i hydroksylowych tych związków w komórce roślin mogą zostać przyłączone reszty cukrowe. Dzięki takiemu zabiegowi powstała pochodna związku toksycznego może stać się mniej toksyczna, bardziej hydrofilowa, co wiąże się z łatwiejszym transportem, a także bardziej podatna na dalsze modyfikacje (5).

3.2.2. Glutation i S-transferaza glutationowa

Glutation jest trójpeptydem składającym się z reszt kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Reszta cysteiny połączona jest z resztą glutaminową poprzez grupę γ -karboksylową. Cysteina jest również źródłem ważnej dla tego związku grupy tiolowej.

Zredukowana forma glutationu (GSH) ulega w komórce wzajemnym przejściom z formą utlenioną zawierającą wiązanie disiarczkowe (GSSG), pełniąc rolę buforu hydrosulfidowego. Przy współudziale obecnych w komórce enzymów glutation bierze udział w wielu reakcjach detoksyfikacji i obrony w komórkach roślin jak i zwierząt. Wraz z peroksydazami zaangażowany jest w odtruwanie komórek z nadtlenu organicznych jak i nadtlenu wodoru będących produktami metabolizmu tlenowego. Glutation, jako prekursor fitochelatyn, zaangażowany jest w fitoremediację metali ciężkich (24-26).

S-transferaza glutationowa (GST) to enzym izolowany głównie w formie homodimeru. W genomie rośliny może wystąpić nawet ponad 20 genów GST dlatego poznano i wyizolowano również szereg form heterodimerycznych. To właśnie te heterodimeryczne formy budzą największe zainteresowanie naukowców, gdyż ich obecność, jak się wydaje, jest indukowana poziomem fitohormonów i warunkami stresowymi. Do czynników wpływających na ekspresję genów GST zalicza się m.in. auksyny i ich analogi, cytokininy, stres tlenowy, H_2O_2 , etanol i etylen. Ponadto na ekspresję genów GST wpływa obecność samego GSH i zanieczyszczeń w postaci metali ciężkich i herbicydów stanowiących substraty dla tego enzymu. Indukcję aktywności GST można zaobserwować już kilka godzin po kontakcie komórki z ksenobiotykami i hormonami, co oznacza, że mechanizm ekspresji i syntezy *de novo* podjednostek GST jest wyjątkowo czuły i efektywny (27).

Glutation i S-transferaza glutationowa współdziałają ze sobą w procesie detoksykacji zanieczyszczeń organicznych, który polega w tym przypadku na utworzeniu koniugatów pomiędzy grupą sulfidową glutationu a elektrofilnym (ubogim w elektrony) rejonem cząsteczki stanowiącej zanieczyszczenie. Proces ten może zajść spontanicznie jednakże obecność S-transferazy glutationowej przyspiesza przebieg reakcji, ponieważ enzym ten wpływa na osiągnięcie przez substraty odpowiedniego ułożenia przestrzennego.

Glutation w związku ze swoim składem aminokwasowym i dwóm wiązaniom peptydowym jest cząsteczką silnie hydrofilową. W wyniku utworzenia koniugatu z lipofilną cząsteczką zanieczyszczenia powstaje zatem amfipatyczny (amfifilny) produkt o większej mobilności niż wyjściowa cząsteczka zanieczyszczenia. Roślina unika akumulacji zanieczyszczenia w kompartmentach komórki skracając czas ekspozycji na zanieczyszczenie i okres półrozpadu cząsteczki będącej jego przyczyną. Stężenie koniugatów w cytoplazmie utrzymywane jest w roślinie na niskim poziomie, gdyż mogą one stanowić inhibitory enzymów występujących w cytoplazmie, a w szczególności S-transferazy glutationowej i reduktazy glutationowej. Komórka unika tego zagrożenia dzięki działalności ATP-zależnych pomp obecnych w tonoplaście, dzięki którym koniugaty zostają przeniesione do wakuoli. Uważa się, że utworzenie koniugatu z glutationem stanowi swoiste oznakowanie cząsteczki odbierane jako sygnał do usunięcia jej z cytoplazmy i deponowanie w wakuoli. Wakuola pełni tu funkcję ostatecznego magazynu cząsteczek zbędnych i niebezpiecznych dla komórki (27).

Koniugaty te można jednak potraktować jedynie za przejściowe produkty detoksykacji, gdyż dzięki aktywności specyficznych karboksypeptydaz wewnątrz wakuoli następuje oddzielenie od koniugatu cząsteczki glicyny, a następnie dzięki dipeptydazie cząsteczki kwasu glutaminowego. W wyniku tych reakcji z cząsteczką zanieczyszczenia pozostaje połączona jedynie cysteina. Koniugat ten może opuścić wakuolę i w wyniku reakcji katalizowanych przez liazę cysteinową i glukozylotransferazy utworzyć koniugaty drugiego rzędu. Ich ostatecznym losem może być sekrecja i przechowanie w ścianie komórkowej, jak i całkowite wydzielenie do ryzosfery.

Z punktu widzenia fitoremediacji istotne jest nie tylko istnienie enzymów współdziałających z glutationem (GST, karboksypeptydaz), ale i enzymów uczestniczących w jego syntezie. Nadekspresja genów syntetazy γ -glutamylcysteinowej oraz syntetazy glutationowej w istotny sposób wpływa na zwiększenie poziomu glutationu w komórkach, a przez to zwiększa tolerancję całej rośliny na niektóre organiczne ksenobiotyki (9).

4. Znaczenie mikroorganizmów w remediacji

Degradacja organicznych zanieczyszczeń przez mikroorganizmy zachodzi w przyrodzie głównie ze względu na ich używanie przez bakterie i grzyby jako źródła nie tylko węgla, ale i elektronów uczestniczących w pozyskiwaniu energii w celu wzro-

stu i reprodukcji. Ich degradacja odbywa się na drodze oddychania beztlenowego, fermentacji czy redukcyjnej dehalogenacji (14). Ponadto bakterie mogą być zmodyfikowane tak by produkować konkretne enzymy metabolizujące odpady przemysłowe toksyczne dla innych organizmów żywych. Pomocne są tu osiągnięcia z dziedziny genetyki/inżynierii genetycznej i enzymologii.

W degradację węglowodorów zaangażowany jest szereg mikroorganizmów w tym bakterie, takie jak: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* i *Nocardia*, a także grzyby *Aspergillus ochraceus*, *Cunninghamella elegans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Syncephalastrum racemosum* (6,14).

Techniki wykorzystujące bakterie w bioremediacji zostały wprowadzone m.in. przez firmę Envirogen, która wprowadziła rekombinanty degradujące PCB (polichlorowane bifenylole) o zwiększonej stabilności i przeżywalności, jak również naturalnie występujące bakterie degradujące trichloroetylen (TCE) w obecności toluenu stanowiącego rozpuszczalnik organiczny śmiertelny dla innych mikroorganizmów. Technologie tej firmy oparte na bioremediacji znajdują ponadto zastosowanie w remediacji MTBE (metylo- t-butylowy eter) i TNT (28).

Oprócz bezpośredniej obróbki związków toksycznych mikroorganizmy są w stanie produkować składniki powierzchniowo czynne zdolne emulgować rozpuszczalniki organiczne i ułatwiać ich usunięcie. Substancje takie – pochodzenia bakteryjnego – są mniej toksyczne i ulegają biodegradacji w odróżnieniu od surfaktantów produkowanych przez człowieka.

Mikroorganizmy zdolne metabolizować WWA wyizolowano m.in. z rejonów bogatych w złoża ropy naftowej, gaz ziemny, a także gleby oraz wody zanieczyszczonej WWA. Właściwości metabolizowania WWA wykazano w próbach laboratoryjnych, a także w naturze. Niektóre z tych mikroorganizmów wykorzystują WWA jako wyłączne źródło węgla i energii, inne kometabolizują je (13).

Szereg szczepów bakterii *Pseudomonas* sp. posłużyło w badaniach jako źródło genów dla enzymów fazy inicjacji degradacji. Geny te oznaczono m.in. jako *nah*, *ndo*, *pah* i *dox*, a ich sekwencje są identyczne w ok. 90%. Geny typu-*nah*, jak się wydaje, są szeroko rozpowszechnione i przez to stanowią potencjalne narzędzie w detekcji i monitorowaniu występowania bakterii degradujących WWA w środowisku, nie są to jednak jedyne geny pozwalające na katabolizm zanieczyszczeń organicznych (13).

5. Współdziałanie mikroorganizmów i roślin wyższych

Współdziałanie mikroorganizmów i roślin wyższych możliwe jest dzięki efektowi ryzosfery, jaki rośliny wywierają na środowisko glebowe. Rośliny wydzielają do warstw gleby będących w bezpośrednim kontakcie z korzeniami związki takie jak cukry, kwasy i alkohole stanowiące od 10 do 20% masy uzyskanej w rocznej fotosyn-

tezie. Zapewniają tym samym mikroorganizmom dodatkowe źródło węgla i energii często stymulując je do lepszego wzrostu. Uważa się, że jest to główną przyczyną zwiększonej degradacji zanieczyszczeń w ryzosferze, w związku z czym mówi się o ryzodegradacji, fitostymulacji lub też bioremediacji wspomaganej przez rośliny (14,29).

Mikroorganizmy wspomagają fitoremediację poprzez redukcję fitotoksyczności zanieczyszczeń do poziomu pozwalającego na wzrost i rozwój roślin o mniejszej tolerancji na zanieczyszczenia, przez co umożliwiają remediację związków nie wykazujących fitotoksyczności, ale im towarzyszących. Podejrzewa się nawet, że rośliny i mikroorganizmy koewoluowały razem w sposób zapewniający obu partnerom korzyści odnoszone w wyniku istnienia efektu ryzosfery (13). Obecnie duże nadzieje wiąże się z endofitycznymi bakteriami wspomagającymi degradację zanieczyszczeń organicznych (jak np. toluenu w przypadku bakterii *Burkholderia cepacia*) i zmniejszającymi ich emisję do atmosfery w procesie fitowolatylicacji (30).

6. Zastosowanie roślin w fitoremediacji

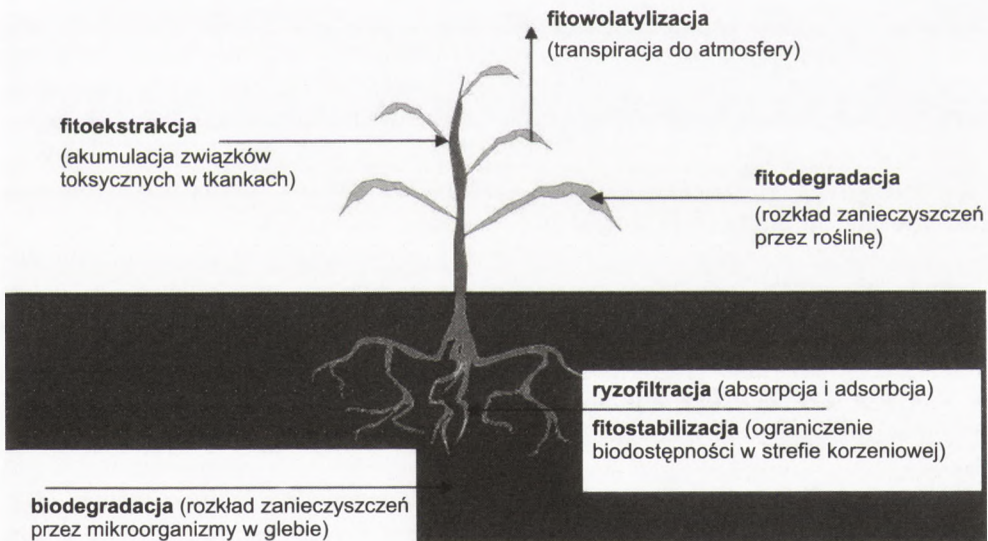
Ze względu na stosunkowo łatwe przeprowadzanie badań laboratoryjnych na mikroorganizmach (przede wszystkim krótki czas hodowli) dane na temat zdolności bioremediacji związków organicznych przez te organizmy są dość obszerne. W przypadku roślin wyższych dane na temat mechanizmów fitoremediacji zanieczyszczeń organicznych pochodzą w dużej mierze z badań z wykorzystaniem kultur komórkowych. Ponieważ jednak w środowisku naturalnym proces fitoremediacji przeprowadzają całe organizmy roślinne, to dopiero badania polowe są w stanie dostarczyć ostatecznych dowodów na skuteczność danej rośliny w procesie fitoremediacji. Najobszerniejsze dane dotyczą gatunków roślin zaangażowanych w fitoremediację metali ciężkich. Wiedza na temat roślin zdolnych do fitoremediacji zanieczyszczeń organicznych jest bardziej ograniczona, pozwala jednakże stwierdzić, że dobre efekty remediacji zanieczyszczeń organicznych dają gatunki zaliczane do rodzin takich jak *Salicaceae*, *Gramineae*, *Polygonaceae*, *Rosaceae*, *Betulaceae*, *Leguminosae* i *Compositae* (31).

Jedne z najlepszych efektów w fitoremediacji zanieczyszczeń organicznych (a szczególnie pestycydów) dają topole należące do rodziny *Salicaceae*. Możliwe jest to dzięki rozwijaniu przez te drzewa systemu korzeniowego na głębokość kilku metrów w głąb ziemi. Dzięki intensywnej transpiracji rośliny te pobierają zanieczyszczenia działając jak swoiste pompy napędzane energią słoneczną. Z tego względu topole zdolne są na zasadzie fitoewaporacji usuwać z gleby związki, takie jak: fenol, benzen, toluen, *m*-ksylen, pentachlorofenol, zaś dzięki ryzodegradacji topole radzą sobie z zanieczyszczeniami w postaci benzenu, toluenu i *o*-ksylenu (31).

Dzięki współpracy z mikroorganizmami również drzewa takie jak brzozy (*Betula* sp.), robinie akacjowe (*Robinia pseudacacia*), dzikie jabłonie (*Malus* sp.) i morwy

(*Morus* sp.) zdolne są do przeprowadzenia procesu remediacji środowiska poprzez stymulację mikroorganizmów z wydzielanymi przez siebie związkami fenolowymi. Wśród roślin zielnych na dużą wagę zasługuje lucerna (*Medicago sativa*) w przypadku której udokumentowano przeprowadzanie ryzodegradacji związków, takich jak: antracen, fenol, piren, toluen, a także fitostabilizację naftalenu. Lucerna wykazuje również tolerancję na WWA, benzen i paliwo Diesla. Udokumentowane są również zdolności popularnej w uprawie rolniczej soi (*Glycine max*) do fitoremediacji poprzez stabilizację i degradację antracenu i fenantrenu. Potencjał fitoremediacyjny wykazują również różnorodne gatunki koniczyny (*Triforium* sp.), pszenica (*Triticum aestivum*), słonecznik (*Helianthus annuus*), kukurydza (*Zea mays*) (31-33).

Rośliny w odróżnieniu od mikroorganizmów przeprowadzają degradację zanieczyszczeń organicznych tylko w niewielkim stopniu i dlatego problemem pozostaje usunięcie ze środowiska roślin skażonych pobranymi ksenobiotykami i ich metabolitami. O ile w przypadku fitoremediacji metali spalanie roślin pozwala na ich odzyskanie (*phytomining*) nawet w skali kilkuset kilogramów z hektara rocznie (34), w przypadku zanieczyszczeń organicznych podobny odzysk jest bezcelowy. Utylizacja skażonych roślin (np. również w postaci kontrolowanego spalania) może być tańsza niż tradycyjne metody remediacji i spopielanie samej ziemi (35).



Rys. Techniki remediacji z wykorzystaniem mikroorganizmów i roślin.

6.1. Potencjalne zastosowanie roślin transgenicznych w fitoremediacji

Oprócz naturalnie występujących gatunków roślin prowadzących procesy fitoremediacji podjęto się otrzymać rośliny o zwiększonym potencjale fitoremediacji poprzez tworzenie hybryd międzygatunkowych i genetycznie zmodyfikowanych organizmów. Szczególnie korzystne, jak się wydaje, jest „ulepszanie” topoli charakteryzującej się szybkim wzrostem i dużą transpiracją.

Krzyżówki topoli stosowano dla różnych celów już od końca XIX w. Wiele spośród ponad 25 gatunków topoli zdolnych jest do krzyżowania się w naturze jak i dzięki zabiegom człowieka dzięki czemu znajdują spore zastosowanie w fitoremediacji pestycydów. Stosowane są również jako swoiste bufory chroniące zbiorniki wodne przed nawozami. Obecnie trwają badania nad ich zastosowaniem jako barier hydraulicznych przed zanieczyszczeniami w postaci benzyny czy paliwa Diesla (9).

Popularnie w fitoremediacji stosowana jest m.in. krzyżówka *Populus trichocarpa* i *Populus deltoides* (*Populus trichocarpa* x *deltoides*) charakteryzująca się liśćmi o czterokrotnie większej powierzchni niż gatunki rodzicielskie. W związku ze wzrostem powierzchni blaszki liściowej wzrasta i tak duża transpiracja, co pozwala tym hybrydom na wydajniejsze pobieranie wody i zanieczyszczeń w niej rozpuszczonych. Inną popularnie stosowaną krzyżówką topoli jest *Populus euramericana*, powstała z gatunków *P. deltoides* i *P. nigra* występujących odpowiednio w Ameryce Północnej i Europie ma szansę na znalezienie zastosowania w fitoremediacji m.in. TNT (29).

Genetycznie zmodyfikowane topole wykazujące nadekspresję syntetazy γ -glutamylcysteinowej (γ -ECS) są znacznie bardziej tolerancyjne na herbicydy w porównaniu z nietransformowanymi dzikimi gatunkami. Wynika to z metabolizowania herbicydów przez topole po uprzednim utworzeniu przejściowych substratów w postaci koniugatów herbicydu glutationem. Zwiększona ilość enzymu uczestniczącego w syntezie glutationu uważana jest za główną przyczynę takiego efektu. Dowodem tego jest zwiększona zawartość glutationu w tkankach topoli transgenicznej po potraktowaniu jej roztworami herbicydów (36). Nadzieje na jeszcze lepsze efekty wiąże się obecnie z wprowadzaniem do genomu topoli genów kodujących izoenzymy GST specyficzne pod względem herbicydów jako substratów.

Inne modyfikacje spotykane w stosowanej fitoremediacji to wprowadzenie zespołu bakteryjnych genów *cbnR-ABCD* (gen *cbnA* koduje enzym 1,2-dioksygenazę katecholową) do genomu ryżu i rośliny zdolnej do redukcji zanieczyszczenia gleby i wód powierzchniowych (głównie pestycydów) (17).

Ponadto naukowcom udało się wzbogacić roślinny system cytochromów P450 o cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) pochodzący z organizmów ssaków poprzez wprowadzenie do genomu roślinnego jego sekwencji cDNA. Cytochrom ten umożliwia oksydację szerokiego zakresu związków m.in. benzenu, TCE, chlorku winylu (37). W transgenicznym ryżu uzyskano koekspresję ludzkich cytochromów CYP1A1, CYP2B6 oraz CYP2C19 wpływającą na znaczną tolerancję i degradację herbicydów (38). Ist-

nienie licznych wariantów cytochromów P450 pozwala mieć nadzieję na fitoremediację szerokiego zakresu związków organicznych.

Tabela

Wykonane dotąd przykładowe modyfikacje roślin w celu ich użycia do fitoremediacji zanieczyszczeń organicznych

Gen	Źródło genu	Roślina docelowa	Produkt genu	Obserwowane efekty
<i>nfsl</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	nitroreduktaza aromatyczna	wzrost tolerancji i degradacja TNT
<i>cbnA</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>Oryza sativa</i>	dioksygenaza chloro-katecholowa	degradacja chlorokatecholi
<i>onr</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	reduktaza PETN	degradacja nitrogliceryny, wzrost tolerancji i degradacja niskich stężeń TNT
<i>CYP1A1</i> <i>CYP2B6</i> <i>CYP2C19</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Oryza sativa</i> <i>Solanum tuberosum</i>	<i>CYP1A1</i> <i>CYP2B6</i> <i>CYP2C19</i>	wzrost tolerancji na herbicydy, degradacja herbicydów
<i>gsbl</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	γ -ECS	wzrost tolerancji na herbicydy

7. Podsumowanie

W związku z użyciem w biotechnologii środowiskowej bakterii, grzybów i roślin jako obiektów wykonujących trudne zadanie oczyszczenia środowiska pojawiają się na jej temat zarówno opinie pozytywne jak i nieszczące krytyki.

Techniki zarówno bio- jak i fitoremediacji z powodzeniem stosowane są do usuwania skażeń związkami ropopochodnymi w Stanach Zjednoczonych m.in. na terenach poligonów wojskowych. Polskie ziemie skażone węglowodorami ropopochodnymi coraz częściej poddawane są bioremediacji z zastosowaniem naturalnie występujących w skażonej glebie szczepów bakteryjnych czy też hydrobiopreparatów *in situ* lub w postaci specjalnie tworzonych pryzm – *ex situ* w wersji *on site*. Technologia te stosowane są zarówno przez instytucje państwowe jak np. Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych (IETU) nadzorowany przez ministra środowiska jak i komercyjne firmy działające na terenie Polski (Prote) oraz Europy (Dekonta) (39-41). Dzięki ich projektom i działalności przeprowadzana jest m.in. bioremediacja terenów Rafinerii Czechowice-Dziedzice S.A. w Czechowicach-Dziedzicach oraz prowadzone są prace dla Polskiego Koncernu Naftowego ORLEN S.A. Przedsiębiorstwa Eksploatacji Rurociągów Naftowych „Przyjaźń”, Polskich Kolei Państwowych (na terenach stacji paliw, przejazdów kolejowych i miejsc katastrof kolejowych) (39,41).

7.1. Zalety

Technologia bio- i fitoremediacji jest stosunkowo mało inwazyjna dla środowiska, gdyż jako metoda *in situ* nie wymaga naruszania struktury gleby związanego z odkopywaniem, zdejmowaniem jej warstw czy tworzeniem instalacji mechanicznych jak w przypadku metod konwencjonalnych. Ponadto po zakończeniu procesu gleba jest w stanie służyć jako użytki rolne i gospodarcze.

Dzięki temu, że źródłem energii dla uczestniczących w remediacji bakterii są same zanieczyszczenia, a dla rośliny energia słoneczna koszty zastosowania tej metody ulegają poważnemu obniżeniu.

Ponadto technologie te cieszą się dużą akceptacją społeczeństwa, czego efektem jest utworzenie grup badawczych zajmujących się remediacją zanieczyszczeń organicznych w ramach Europejskiego Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych znanego pod akronimem COST. Zaangażowanie tak poważnej organizacji w badania nad zastosowaniem bioremediacji i fitoremediacji wskazuje, że technologia ta posiada znaczący potencjał by służyć człowiekowi w celu oczyszczenia środowiska z zanieczyszczeń organicznych (9,14,17,29).

7.2. Ograniczenia

Stosowanie kultur mikroorganizmów, jak się wydaje, nie ma poważniejszych przeszkód z wyjątkiem wprowadzania do środowiska organizmów zmodyfikowanych genetycznie. Lęk ten dotyczy również stosowania genetycznie zmodyfikowanych roślin wyższych. Ponadto na niekorzyść roślin wyższych przemawia ich ograniczone tempo wzrostu oraz długość sezonu wegetacyjnego, które zależą zarówno od gatunku rośliny jak i warunków atmosferycznych i geograficznych środowiska. Ponadto fitoremediacja ogranicza się do oczyszczania wód gruntowych i przeważnie płytkich warstw gleby, co jest wynikiem budowy anatomicznej systemów korzeniowych rośliny. Zastosowanie organizmów roślinnych stwarza również możliwość wniknięcia zanieczyszczeń lub produktów ich degradacji do łańcucha pokarmowego (9,29).

Wszelkie ograniczenia można jednak częściowo obejść odpowiednio dobierając gatunek rośliny stanowiącej podstawę procesu. Cechy takie jak rozbudowany system korzeniowy, wysoka tolerancja na zanieczyszczenia, szybki przyrost biomasy czy niewchodzenie do łańcucha pokarmowego ustalone jako swoiste kryteria pozwolą na zwiększenie efektywności fitoremediacji.

Praca finansowana z grantu KBN nr 2P04G06926.

Literatura

1. Gawroński S. W., (2000), *Fitoremediacja – nowym instrumentem rekultywacji w kontekście gospodarki terenami*, Zeszyt KIN 3 – Raport z Seminarium pt. „Restrukturyzacja terenów przemysłowych Obszar Kraków-Wschód na tle doświadczeń zakładów «Solvay»”, (Fundacja Krakowski Instytut Nieruchomości).
2. Schröder P., Harvey P. J., Schwitzguébe J. P., (2002), *Environmental Science and Pollution Research*, 9 (1), 1-3.
3. Harwood C. S., Gibson J., (1997), *Journal of Bacteriology*, 179(2), 301-309.
4. Klimaszewska K., (1998), *Biotechnologia*, 1 (40), 140-148.
5. Harvey P. J., Campanella B. F., Castro P. M. L., Harms H., Lichtfouse E., Schaffner A. R., Smrcek S., Werck-Reichhart D., (2002), *Environmental Science and Pollution Research*, 9 (1), 29-47.
6. Kanaly R. A., Harayama S., (2000), *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
7. EPA, (1998), *A Citizen's Guide to Phytoremediation*, (www.clu-in.org/download/remed/phyto2.pdf)
8. Esteve-Nunez A., Caballero A., Ramos J. L., (2001), *Microbiology and Molecular Biology*, 65(3), 335-352.
9. Chappell J., (1997), *Phytoremediation of TCE using Populus*. Status Report prepared for the U.S. EPA Technology Innovation Office under a National Network of Environmental Management Studies Fellowship. (www.clu-in.org/download/remed/phytotce.pdf)
10. Dz. U., nr 130, poz 1391; Dz. U., nr 165, poz 1359.
11. Charakterystyka substancji priorytetowych. Ministerstwo Środowiska, Warszawa, (2004), http://www.mos.gov.pl/1strony_tematyczne/substancje_szczegolnie_szkodliwe/charakterystyka.pdf
12. Davies J. I., Evans W. C., (1964), *Biochemical Journal*, 91(2), 251-261.
13. Goyal A. K., Zylstra G. J., (1996), *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1, 230-236.
14. Frick C. M., Farrell R. E., Germida J. J., (1999), *Assessment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites*, (www.ag.usask.ca/departments/scsr/department/research/phytosurveys.pdf)
15. Yen K. M., Serdar C. M., (1988), *Crit Rev Microbiol.*, 15(3), 247-268.
16. Eungbin K., Garben J. Z., (1995), *Journal of Bacteriology*, 177, 11, 3095-3103.
17. Shimizu M., Kimura T., Koyama T., Suzuki K., Ogawa N., Miyashita K., Sakka K., Ohmiya K., (2002), *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8, 4061-4066.
18. Kvesitadze G., Gordeziani M., Khatishashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J. J., (2001), *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 1, 49-57.
19. Harvey P. J., Xiang M., Palmer J. M., (2002), *Extracellular Enzymes in the Rhizosphere* ([lbewwww.epfl.ch/COST837/grainau/W4.pdf](http://www.epfl.ch/COST837/grainau/W4.pdf))
20. Bogan B. W., Schoenike B., Lamar R. T., Cullen D., (1996), *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 7, 2381-2386.
21. Livingstone D. R., (1998), *Comparative Biochemistry and Physiology, A, Molecular & Integrative* 120, 43-49.
22. Hassler J. A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck J. R., Farrell G., Kaminsky L., Spivack S. D., Boitier E., Beaune P., (1999), *Molecular Aspects of Medicine* 20, 1-137.
23. www.biobase.dk/p450/
24. Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H., (1987), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(2), 439-443.
25. Tukendorf A., (1989), *Postępy Biochemii*, 35, 141-153.
26. Piechalak A., Tomaszewska B., Barańkiewicz D., Malecka A., (2002), *Phytochemistry*, 60, 153-162.
27. *Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment*, (2001), Eds. Grill D., Tausz M., de Kok L. J., Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, 155-177.
28. www.envirogen.com
29. Susarla S., Medina V. F., McCutcheon S. C., (2002), *Ecological Engineering*, 18, 647-658.
30. Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., Lelie D., (2004), *Nature Biotechnology*, 22, 5, 583-588.

31. Gawroński S. W., (2002), Plant Species: Candidates for Phytoremediation of Organic Pollutants. ([lbewwww.epfl.ch/COST837/grainau/W4.pdf](http://bewwww.epfl.ch/COST837/grainau/W4.pdf))
32. Newman L. A., Reynolds C. M., (2004), *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 225-230.
33. www.phytopet.usask.ca Soil Science: Phytoremediation Online Database
34. Chaney R. L., (2002), *Agricultural Research*, (August), 50, 8, 19.
35. Belz K. E., (1997), Phytoremediation, Soil and groundwater pollution, Civil Engineering Dept. Virginia Tech (<http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/gwprimer/phyto/phyto.html>)
36. Gullner G., Komives T., Rennenberg H., (2001), *Journal of Experimental Botany*, 52, 358, 971-979.
37. Doty S. L., Shang T. Q., Wilson A. M., Tangen J., Westergreen A. D., Newman L. A., Strand S. E., Gordon M. P., (2000), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12, 6287-6291.
38. Kawahigashi H., Hirose S., Inui H., Ohkawa H., Ohkawa Y., (2005), *Plant Science*, 168, 773-781.
39. <http://www.ietu.katowice.pl/>
40. <http://www.dekonta.pl>, <http://www.dekonta.cz/cz/index.php?lang=en>
41. <http://www.prote.pl>