

Fitoremediacja jako antidotum na zanieczyszczenie środowiska

Ewa MUSZYŃSKA^{1*}, Ewa HANUS-FAJERSKA², Krystyna CIARKOWSKA³

¹ *Katedra Botaniki, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa*

² *Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków*

³ *Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków*

Wprowadzenie

Postępujące skażenie otaczającego nas świata metalami ciężkimi sprawia, że konieczne staje się poszukiwanie skutecznych sposobów jego oczyszczenia. W ostatnich dekadach szczególna uwaga skierowana jest na biologiczne metody remediacji środowiska, do opracowania których przyczynił się znaczny postęp w zrozumieniu reakcji poszczególnych grup organizmów na obecność stresora, a także poznanie fizjologicznych i molekularnych mechanizmów pobierania i neutralizacji toksycznych związków przez organizmy żywe. W bioremediacji wykorzystuje się bakterie, glony, grzyby oraz rośliny w celu usuwania lub detoksykacji metali ciężkich, substancji radioaktywnych i związków organicznych występujących w zanieczyszczonym środowisku (Kumar i in. 2011, Ali i in. 2013).

Wśród biologicznych metod wyróżnia się zabiegi określane mianem fitoremediacji. Termin ten pochodzi z połączenia greckiego słowa *phyton* – roślina i łacińskiego *remedium* – środek przeciwko

złu. Idea zastosowania roślin do poprawy jakości środowiska znana była już pod koniec XVIII wieku, kiedy Joseph Priestley, Antoine Lavoissier, Karl Scheele i Jan Ingenhousz wykazali przydatność tej grupy organizmów do oczyszczania powietrza (Rogers 2011, Passalia i in. 2017). Jednak dopiero w latach 80. ubiegłego stulecia pojawiły się pomysły pokrycia roślinnością znacznych powierzchni terenów pogórcznych w celu ich stabilizacji i poprawy walorów estetycznych (Barceló i Poschenrieder 2003). W ten sposób rozwinęła się koncepcja fitoremediacji zakładająca wykorzystanie roślin zdolnych do wzrostu w zanieczyszczonym siedlisku do oczyszczania lub zmniejszania toksyczności wód gruntowych, stojących wód powierzchniowych i cieków oraz gleb i podłoży bezglebowych, pod pojęciem których rozumie się podłoża pochodzenia antropogenicznego nie wykazujące cech właściwych glebie, takie jak na przykład materiały generowane w wyniku aktywności przemysłowej (Lee 2013, Ali i in. 2013, Hanus-Fajerska i Koźmińska 2016). Obecnie, ta obiecująca technologia stanowi alternatywę dla tradycyjnych metod remediacji polegających m.in. na zmianie właściwości fizyko-chemicznych gleb, chemicznym

* Autor korespondujący

unieczynnianiu metali, filtracji czy parowaniu, które są kosztowne i mogą powodować wtórne zanieczyszczenie środowiska (Mench i in. 2010).

Strategie fitoremediacji

Oddziaływanie roślin na substancje zanieczyszczające może przybierać różne formy w zależności od gatunku rośliny, właściwości zanieczyszczeń czy specyficznych warunków panujących w otoczeniu. Często też mechanizmy usuwania lub unieruchamiania substancji toksycznych ze środowiska są bardzo złożone i wymagają połączenia kilku różnych metod. Ze względu na charakter procesu i ośrodek, w jakim on przebiega, wyróżnia się kilka podstawowych technik fitoremediacji. Wśród nich fitostabilizacja, fitoekstrakcja i fitowolatilizacja znajdują zastosowanie w usuwaniu z podłoża metali ciężkich, podczas gdy dwie inne metody – fitodegradacja oraz fitofiltracja nie dotyczą glebowych zanieczyszczeń pierwiastkami metalicznymi (Sarwar i in. 2017). Sposoby usuwania zanieczyszczeń za pomocą fitoremediacji schematycznie przedstawiono na Rycinie 1.

Fitostabilizacja jest techniką, która nie usuwa zanieczyszczeń ze środowiska, ale pozwala na zmniejszenie ich mobilności, a tym samym ogranicza przemieszczanie się toksycznych związków w głąb profilu glebowego oraz w formie pyłów do atmosfery (Muszyńska i in. 2013b). Redukcja dostępności metali następuje poprzez ich unieruchomienie w podłożu dzięki: zwiększonemu pobieraniu w formie jonowej i akumulacji w korzeniach roślin, adsorpcji na powierzchni organów podziemnych lub precypitacji w ryzosferze (Maestri i in. 2010). Fitostabilizacja zaliczana jest również do biologicznych metod utrwalania niestabilnego podłoża zwałowisk i innych stanowisk przemysłowych. Ma ona na celu odtworzenie i utrzymanie zwartej pokrywy roślinnej, pełniącej przede wszystkim funkcje glebotwórcze, przeciwoerozyjne i zabezpieczające przed pyleniem, a także umożliwiające i przyspieszające proces naturalnej kolonizacji (Singh i Santal 2015, Ciarkowska i in. 2017a, Muszyńska i in. 2017).

W odróżnieniu od fitostabilizacji, **fitoekstrakcja** polega na usuwaniu, czyli „ekstrakcji” substancji zanieczyszczających z podłoża (stałego lub

płynnego) poprzez ich pobieranie przez korzenie roślin i akumulację w pędach. Efektywność fitoekstrakcji zależy od dostępności metali w podłożu, ich absorpcji przez podziemne części roślin oraz łatwości transportu do części nadziemnych (Muszyńska i Hanus-Fajerska 2015, Sarwar i in. 2017). Każdy z tych etapów może stanowić czynnik zmniejszający skuteczność prowadzonej fitoekstrakcji, stąd badania nad tym procesem wymagają interdyscyplinarnej współpracy specjalistów z dziedziny gleboznawstwa, mikrobiologii i fizjologii roślin. Obecnie technika ta jest najbardziej rozpowszechnioną i opłacalną metodą oczyszczania gleb skażonych metalami ciężkimi i substancjami radioaktywnymi, w wyniku czego często błędnie uważana jest za synonim fitoremediacji, która stanowi znacznie szersze pojęcie i obejmuje także inne techniki postępowania z substancjami toksycznymi.

Na obszarach skażonych selenem, rtęcią i arsenem, stosuje się technikę **fitowolatilizacji** (syn. fitoewaporacji, firoodparowania), której celem jest pobranie tych pierwiastków z gleby, a następnie ich przekształcenie i odparowanie do atmosfery w znacznie mniej toksycznych formach (Sarwar i in. 2017). Najlepiej poznanym przykładem fitoewaporacji jest konwertowanie selenu do dwuselenku dwumetylu lub selenometioniny, odznaczających się od 500 do 700 razy mniejszą szkodliwością niż selen w formie pierwotnej (Jabeen i in. 2009). Takie zdolności posiada *Brassica juncea* (L.) Czern., podczas gdy *Pteris vittata* L. uwalnia do atmosfery arsen (Sakakibara i in. 2010). W przypadku skażenia gleb rtęcią (Hg), usuwanie jej związków jest bardzo trudne, gdyż nie są znane gatunki roślin zdolne do konwersji tego pierwiastka. W warunkach naturalnych fitowolatilizację rtęci przeprowadzają jednak liczne mikroorganizmy. Stosuje się więc metody inżynierii genetycznej, wprowadzając bakteryjne geny kodujące enzymy katalizujące reakcję redukcji Hg^{2+} do Hg^0 do organizmów roślinnych, dzięki czemu uzyskują one pożądaną cechę. W ten sposób zmodyfikowano już *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Nicotiana tabacum* L., *Liriodendron tulipifera* L., niemniej eksperymenty te nie wyszły jak dotąd poza etap badań wstępnych (Kozmińska i in. 2018).

Fitodegradacja (syn. fitotransformacja), polega na wykorzystaniu roślin do rozkładu zanieczyszczeń

organicznych, m.in. węglowodorów aromatycznych, pestycydów czy wybielaczy. W osiągnięciu tego celu wykorzystywane są rośliny, które pobierają i przekształcają toksyczne związki za pomocą enzymów cyklu metabolicznego, takich jak np. peroksydazy odpowiedzialne za rozkład związków fenolowych, nitylasy – za rozkład cyjanin i związków aromatycznych, fosfatazy – za degradację pestycydów organofosforowych. Rozkład pobranych substancji może być całkowity – do dwutlenku węgla i wody, lub częściowy, a wtedy powstałe produkty mogą zostać włączone w struktury roślinne, np. na drodze lignifikacji (Lee 2013). Przykładowym gatunkiem używanym w tej technice jest *B. juncea* zdolna do transformacji wysoko toksycznych insektycydów fosfoorganicznych (Rani i in. 2012).

W trakcie oczyszczania zbiorników wodnych z niewielkich stężeń metali ciężkich lub związków radioaktywnych, można posłużyć się metodą **fitofiltracji**, która wykorzystuje zdolność korzeni roślin (ryzofiltracja) lub siewek (blastofiltracja) do adsorbowania zanieczyszczeń z roztworów (Singh i Santal 2015, Hanus-Fajerska i Koźmińska 2016). Fitofiltracja znajduje zastosowanie podczas oczyszczania wód powierzchniowych i gruntowych oraz ścieków przemysłowych (np. kopalnianych). Natomiast do utylizacji ścieków komunalnych (zawierających niejednokrotnie znaczne ilości metali) coraz częściej zakładane są niewielkie oczyszczalnie przydomowe oparte na wybranych gatunkach *Salix* L., *Populus* L., *Phragmites* Adans., *Typha* L., *Scirpus* L. i innych roślin typowych dla terenów podmokłych (Lee 2013). Ten sposób fitoremediacji pozwolił na skuteczne usunięcie cezu i strontu ze zbiorników wokół elektrowni atomowej w Czarnobylu. W tym zabiegu pomocne okazały się hydroponiczne kultury *Helianthus annuus* L., gdyż rośliny tego gatunku zakumulowały duże ilości cezu w korzeniach, zaś stront został przetransportowany do pędów (Gwóźdź i Kopyra 2003, Lee 2013, Hanus-Fajerska i Koźmińska 2016).

Kryteria doboru roślin do fitoremediacji

Podstawowym warunkiem przydatności biologicznych metod oczyszczania środowiska jest odpowiedni dobór gatunków roślin, które tolerują wysokie stężenia substancji toksycznych charakteryzujące

dany obiekt poddawany temu zabiegowi, a także cechują się: szybkim wzrostem, dużą produkcją biomasy, rozbudowanym systemem korzeniowym, odpornością na niekorzystne warunki siedliskowe i potencjalne stresory biotyczne, jak patogeny czy gradacje szkodników. Możliwości wykorzystania poszczególnych gatunków w określonych technikach fitoremediacji ocenia się również na podstawie wartości współczynnika biokoncentracji (BCF) oraz współczynnika translokacji (TF). Pierwszy z nich (BCF), wyraża stosunek zawartości danego pierwiastka w biomasie do jego zawartości w podłożu, a tym samym wskazuje na zdolności akumulacyjne testowanego gatunku. Z kolei współczynnik translokacji określa stosunek zawartości danego pierwiastka w częściach nadziemnych do zawartości w korzeniach i mówi o łatwości przemieszczania się pierwiastków w obrębie organizmu. Ponadto, stosowanie niektórych technologii fitoremediacji wymaga również łatwości uprawy i zbioru roślin, a w przypadku roślin zmodyfikowanych genetycznie także stabilności nowej cechy w kolejnych pokoleniach (Mench i in. 2010, Ali i in. 2013, Pandey i in. 2015). W zakresie fitoremediacji metali ciężkich z gleb, najczęściej stosowane są techniki fitostabilizacji i fitoekstrakcji. Z tego względu, poniżej szczegółowo omówiono cechy roślin warunkujące ich przydatność do zastosowania tylko w tych dwóch przeciwstawnych metodach.

Fitostabilizacja versus fitoekstrakcja

Rośliny wykorzystywane w technologii fitostabilizacji powinny cechować się przede wszystkim mocno rozgałęzionym i silnie przerastającym podłożem systemem korzeniowym, a także wysokim współczynnikiem biokoncentracji metali oraz niskim współczynnikiem translokacji (poniżej jedności) (Ali i in. 2013). Ich rola w immobilizacji metali polega między innymi na wydzielaniu eksudatów przez korzenie do gleby, takich jak fenole, fitosiderofory, kwasy organiczne, które reagują z jonami metali i wytrącają je w postaci nierozpuszczalnych soli. Podobnie, produkowane przez system korzeniowy związki, takie jak dwutlenek węgla, mogą wpływać na odczyn (pH) gleby, jej potencjał oksydo-redukcyjny, a przez to zmniejszać pulę dostępnych jonów metali w roztworze glebowym

(Martínez-Alcalá i in. 2016). Niemniej, niezależnie od zdolności do sekrecji związków reagujących z toksycznymi jonami, wszystkie rośliny korzystnie oddziałują na inicjację procesów glebotwórczych i przywracanie życia biologicznego na zdegradowanych powierzchniach, umożliwiając tym samym stopniową poprawę jakości podłoża i jego zabezpieczenie przed erozją wodną i wietrzną. Dzięki temu fitostabilizacja stosowana jest powszechnie w trakcie rekultywacji składowisk odpadów pogórnich i pohnitcznych (Mench i in. 2010, Muszyńska i in. 2013a, Dadea i in. 2017, Ciarkowska i in. 2017a). Wprowadzenie stałej, zwartej okrywy roślinnej, prócz wydatnego zmniejszenia uciążliwości zwałowanych odpadów, pełni również ważne funkcje estetyczne. Zrekultywowane z sukcesem zwałowiska pozytywnie oddziałują na krajobraz oraz zwiększają powierzchnię terenów zieleni, co jest szczególnie istotne w przestrzeni poprzemysłowej (Sklenicka i Molnarova 2010, Dadea i in. 2017). Rolę gatunków pionierskich najlepiej spełniają rośliny bobowate (rodzina Fabaceae), które żyjąc w symbiozie z bakteriami *Rhizobium* nie wymagają nawożenia azotowego, a wręcz przeciwnie – wzbogacają podłoże w ten składnik. Rośliny z rodziny Fabaceae często stosuje się w mieszkach z trawami (*Agrostis* sp., *Festuca* sp.), stosunkowo szybko tworzącymi darń, a tym samym pełniącymi funkcję przeciwoerozyjną (Zhang i in. 2010, Vaverková i Adamcová 2018). Nie bez znaczenia pozostaje również zastosowanie na terenach zdewastowanych pionierskich gatunków lasotwórczych (Muszyńska i in. 2013b). Jednym z nich jest *Robinia pseudoacacia* L. o niewielkich wymaganiach siedliskowych, szybkim wzroście i łatwości przyjmowania się i rozprzestrzeniania na nowym terenie. Jako roślina bobowata jest cenna przede wszystkim na gruntach bezazotowych, m.in. na przepalonych zwałach węgla, żwiru i popiołu. Kolejnym gatunkiem o dużym znaczeniu w zagospodarowaniu leśnym terenów poprzemysłowych jest *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., która nie tylko wzbogaca podłoże w azot, ale także dostarcza wartościowej i szybko rozkładającej się ściółki (Claessens i in. 2010). *A. glutinosa* pomimo dużej zdolności przystosowawczej, najlepiej rozwija się na terenach wilgotnych, podczas gdy na gruntach suchych, powinna być stosowana jako gatunek towarzyszący, służący do poprawy jakości gleby (Dadea i in.

2017). Podobnie, *Betula pendula* Roth ze względu na wytrzymałość na zmiany klimatyczne, suszę oraz niedobór składników pokarmowych, a także szybki wzrost i łatwe rozprzestrzenianie się z samosiewu jest często wykorzystywana w zalesianiu najuboższych siedlisk w różnych okręgach przemysłowych (Hanus-Fajerska i in. 2009, Vaverková i Adamcová 2018). Do nasadzeń na terenach zdegradowanych oprócz drzew, doskonale nadają się także krzewy. Wybrane gatunki powinna cechować przede wszystkim zdolność życia w zacienieniu (ze względu na tworzenie warstwy podszytu) oraz łatwość przystosowywania się do środowiska bezglebowego. Poczynając od gatunków najczęściej stosowanych, są to: *Padus serotina* (Ehrh.) Borkh., *Cerasus mahaleb* (L.) Mill., *Ligustrum vulgare* L., *Cornus sanguinea* L., *Symphoricarpos albus* (L.) S. F. Blake, *Crataegus* sp., *Lonicera xylosteum* L., *Sambucus nigra* L. i *Sambucus racemosa* L., *Lycium barbarum* L. (Muszyńska i in. 2013b, Vaverková i Adamcová 2018). Przydatne mogą okazać się również gatunki o małych wymaganiach glebowych, lecz dużych w stosunku do światła, jak na przykład: *Hippophaë rhamnoides* L., *Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim., *Caragana arborescens* Lam., *Rosa canina* L. i *Rosa rugosa* Thunb., *Syringa vulgaris* L. (Borghini i in. 2008, Muszyńska i in. 2013b, 2014, Vaverková i Adamcová 2018). Niektóre z wyżej wymienionych gatunków to ekspansywnie rozrastające się antropofity, które na stałe weszły w skład miejscowej flory, a niekiedy wręcz dominują na rozległych przestrzeniach, zagrażając lokalnej bioróżnorodności (Szarek-Łukaszewska 2009). Z tego względu, podczas doboru materiału roślinnego do rekultywacji należy wziąć pod uwagę konsekwencje przyrodnicze wynikające z inwazji gatunków introdukowanych. W rekonstrukcji zniszczonych siedlisk można wykorzystać metody bazujące na rodzimych, lokalnych zasobach roślin, które spontanicznie opanowują miejsca zdegradowane (Tokarska-Guzik 2000, Tordoff i in. 2000, Szarek-Łukaszewska i in. 2009, Hanus-Fajerska i in. 2013, Pandey i in. 2015, Muszyńska i in. 2017). Choć podejście to stanowi obiecujące rozwiązanie, nadal jest to sposób stosunkowo rzadko stosowany w Polsce. W tego typu metodach rekultywacji przyrodniczej proponuje się trwałe zadarnienie z wykorzystaniem metalofitów jako gatunków lokalnego pochodzenia o utrwalonych przystosowaniach do

nadmiaru metali ciężkich w podłożu, bądź też przenoszenie fragmentów muraw ze starszych hałd na świeżo utworzone składowiska (Szarek-Łukaszewska i in. 2009, Gupta i in. 2013, Muszyńska i in. 2017, Hanus-Fajerska i in. 2019). Przykładowymi gatunkami metalofitów rejonu olkuskiego, które znalazły zastosowanie w fitostabilizacji odpadów po flotacji rud cynku i ołowiu są m.in. *Gypsophila fastigiata* L. (Muszyńska i in. 2015), *Scabiosa ochroleuca* L. (Muszyńska i Hanus-Fajerska 2016), *Dianthus carthusianorum* L. (Ciarkowska i in. 2017a, Muszyńska i Hanus-Fajerska 2017, Muszyńska i in. 2018a).

W przeciwieństwie do fitostabilizacji, fitoekstrakcja wiąże się z mobilizacją jonów metali, ich zwiększonym pobieraniem przez korzenie roślin i transportem w ksylemie oraz gromadzeniem w organach nadziemnych w wysokich stężeniach (Martínez-Alcalá i in. 2016). Satisfakcjonującą skuteczność tego procesu, którego efektywność zależy od ilości metali zakumulowanych w pędach oraz od wielkości biomasy pozyskanej z danej powierzchni, można osiągnąć uprawiając rośliny o wysokim współczynniku bioakumulacji i translokacji (powyżej jedności), szybkim tempie wzrostu, dużym przyroście biomasy oraz rozbudowanym systemie korzeniowym. Stosowane w fitoekstrakcji rośliny powinny charakteryzować się dodatkowo niską atrakcyjnością dla zwierząt, aby ograniczyć przedostawanie się szkodliwych pierwiastków do kolejnych ogniw łańcucha pokarmowego (Sarwar i in. 2017). W fitoekstrakcji zastosowanie znalazły gatunki roślin określane jako hiperakumulatory, w tkankach których koncentracja metali jest od 100 do 1000 razy wyższa w porównaniu do roślin rosnących na glebach nieskażonych oraz od 10 do 100 razy wyższa w stosunku do większości roślin porastających gleby zanieczyszczone metalami ciężkimi (Szarek-Łukaszewska 2014, Muszyńska i Labudda 2019). Jak dotąd opisano jednak niewielką liczbę gatunków wykazujących zdolności hiperakumulujące (około 720 w zależności od kryterium akumulacji i przyjętego układu klasyfikacyjnego) (Muszyńska i Labudda 2019). Chociaż zjawisko hiperakumulacji należy do rzadkości, takie gatunki można także spotkać na terenie hałd w rejonie Olkusza (Nowak i in. 2011). Jednym z nich jest tytułowa bohaterka niniejszego tomu – *Biscutella*

laevigata L. (Babst-Kostecka i in. 2014, Bemowska-Kałabun i in. – Rodział 6, niniejszy tom), jak również *Arabidopsis halleri* (L.) O’Kane & Al-Shehbaz (Verbruggen i in. 2013, Babst-Kostecka i in. 2018). Zarówno wspomniane, jak i inne gatunki hiperakumulatorów cechuje jednak słaby wzrost, niewielki plon z jednostki powierzchni i stosunkowo płytki system korzeniowy, co istotnie ogranicza możliwość ich szerokiego zastosowania w celu oczyszczania środowiska (Gupta i in. 2013, Bulak i in. 2014, Muszyńska i Hanus-Fajerska 2015). Alternatywę dla tej niewielkiej grupy roślin może stanowić zastosowanie gatunków o bardzo silnym przyroście biomasy części nadziemnych, ale umiarkowanej zdolności do gromadzenia metali ciężkich w tkankach. W tym aspekcie, do jednych z najbardziej wydajnych organizmów roślinnych należą różne gatunki gorzyc, na przykład *B. juncea*, gromadząca ołów, kadm, chrom, nikiel, cynk (Revati i in. 2017). Ponadto, biorąc pod uwagę duży plon biomasy, łatwość adaptacji do różnych warunków klimatycznych oraz rozrośnięty do głębokości 50 cm system korzeniowy, gatunek ten można z powodzeniem stosować do usuwania metali, a także zapobiegania przedostaniu się ich rozpuszczalnych form do wód gruntowych (Gwóźdź i Kopyra 2003).

Los roślin stosowanych w fitoremediacji

Oprócz niewątpliwych korzyści jakie niesie za sobą fitoekstrakcja, wciąż otwartym zagadnieniem pozostaje sposób zagospodarowania powstającej w tym procesie dużej ilości biomasy zanieczyszczonej metalami ciężkimi. Problem ten w przypadku fitostabilizacji, której zadaniem jest trwała uprawa roślin na danym terenie, praktycznie nie ma znaczenia. Przeciwnie, rośliny używane w fitoekstrakcji należy usunąć z oczyszczanej powierzchni po zakończeniu okresu wegetacji (Ryc. 2). Po zbiorze, biomasa bogata w metale najczęściej jest spalana w celu uzyskania energii. Powstający popiół stanowi odpad niebezpieczny i jest składowany na specjalnych wysypiskach. Biomasa z metalami można także potraktować jako „biorudę” do wydobywania metali szlachetnych i półszlachetnych (Jabeen i in. 2009, Bulak i in. 2014). Ten wydajny i przyjazny środowisku sposób „wydobycia” metali, określane mianem „górnictwa roślinnego” (ang. *phytomining*),

jest szczególnie istotny w przypadku złóż, których eksploatacja metodami tradycyjnymi jest ekonomicznie nieopłacalna lub z miejsc o zbyt niskiej koncentracji danego pierwiastka by celowe było otwieranie kopalni (Mench i in. 2010, Muszyńska i Hanus-Fajerska 2015). Przykładowo, zastosowanie hiperakumulatorów nikiel – *Alyssum murale* L. i *Alyssum corsicum* Duby do ekstrakcji tego metalu, umożliwiła uzyskanie z jednego hektara plonu biomasy zawierającej 400 kg nikiel, co przy niskich kosztach uprawy roślin i stosunkowo wysokich cenach nikiel staje się wysoce opłacalne (Chaney i in. 2007). Nowym trendem utylizacji biomasy hiperakumulatorów jest wykorzystanie jej jako „eko-katalizatora” do różnych przemian chemicznych (Ryc. 2). W tym aspekcie zastosowanie znalazły na przykład *Anthyllis vulneraria* L. i *Nocca caerulea* (J. Presl & C. Presl) F. K. Mey. zdolne do akumulacji ponad 120 000 mg/kg cynku w pędach (Escande i in. 2014, 2015).

Strategie umożliwiające zwiększenie potencjału fitoremediacyjnego roślin

Modyfikacje genetyczne

Coraz częściej w zwiększaniu potencjału fitoremediacyjnego roślin i możliwości ich zastosowania w określonych technikach oczyszczania środowiska wykorzystuje się metody inżynierii genetycznej. Badania w zakresie uzyskiwania roślin transgenicznych (zmodyfikowanych genetycznie), choć wciąż pozostają w fazie eksperymentów laboratoryjnych, mogą przyczynić się istotnie do rozwoju nowych metod fitoremediacji (Singh i Santal 2015).

Prace inżynierii genetycznej zasadniczo postępują w dwóch kierunkach. Z jednej strony prowadzi się doświadczenia mające na celu zwiększenie odporności roślin na metale ciężkie poprzez modyfikacje genów zaangażowanych w ich reakcje obronne, a w szczególności w mechanizmy naprawy DNA oraz usuwania nadmiaru wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (Faè i in. 2014, Charfeddine i in. 2017). Z drugiej zaś, trwają badania nad modyfikacją hiperakumulatorów w kierunku zwiększenia tempa ich wzrostu i przyrostu biomasy, jak również nad modyfikacją roślin uprawnych o szybkim przyroście biomasy z zamiarem

zwiększenia ich zdolności do pobierania, translokacji i sekwestracji metali (Shen i in. 2011, Shim i in. 2013, Pavlíková i in. 2014, Vrbová i in. 2015, Koźmińska i in. 2018).

Dodatki do podłoża wpływające na warunki wzrostu roślin lub/i dostępność jonów metali

Gleby wymagające remediacji poza wysoką zawartością zanieczyszczeń, zwykle są ubogie w składniki odżywcze. Mają również nieodpowiednie właściwości fizyczne. Przykładowo nie wykazują struktury agregatowej, co skutkuje występowaniem nieprzepuszczalnych warstw i w związku z tym charakteryzują się małą retencją wody dostępnej dla roślin i niewłaściwym składem powietrza glebowego. W celu przeprowadzenia skutecznego oczyszczenia gleby, czyli znacznego zmniejszenia zawartości zanieczyszczeń w rozsądnej perspektywie czasowej, wprowadzane rośliny muszą uzyskać dużą biomasę w krótkim czasie. Z tego powodu konieczne jest wzbogacanie podłoża substancjami organicznymi i/lub nawozami mineralnymi poprawiającymi jego właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne, a w efekcie stymulujące wzrost i rozwój roślin. Wykorzystanie różnorodnych dodatków doglebowych stanowi zatem kolejny kierunek działań mający na celu zwiększanie efektywności procesu fitoremediacji (Weber i in. 2007, Mench i in. 2010, Ciarkowska i in. 2017b).

Wiadomo, że dostarczanie roślinom dużych ilości pierwiastków odżywczych w łatwo dostępnych formach pomaga im przetrwać w trudnych warunkach (Muszyńska i in. 2013). Dlatego zabiegiem najczęściej stosowanym w trakcie rekultywacji jest nawożenie azotem, fosforem i potasem w dwu- lub nawet trzykrotnie większych dawkach w porównaniu do tych, aplikowanych w normalnych warunkach uprawy. Na jałowym terenie niezbędnym jest również inny bardzo ważny składnik gleby, jakim jest materia organiczna, która jest źródłem składników odżywczych i stanowi siedlisko dla mikroorganizmów oraz fauny glebowej, co determinuje aktywność biologiczną gleby (Ciarkowska i in. 2017a). Rozłożona materia organiczna, zwana humusem, jest bardzo kosztownym w produkcji źródłem składników odżywczych. Prowadzono liczne badania dotyczące efektywności innych związków organicznych, głównie produktów ubocznych

różnych gałęzi przemysłu, w polepszaniu jakości podłoża. Wśród nich ważną rolę odgrywają osady ściekowe. Do celów rekultywacyjnych nadają się jedynie komunalne osady ściekowe, które zwykle charakteryzują się obojętnym odczynem, wysoką koncentracją makroelementów (węgla organicznego, azotu, fosforu, magnezu), a także stosunkowo niską zawartością metali ciężkich. Co więcej, obecność substancji organicznych sprzyja wytworzeniu połączeń metaloorganicznych, a w rezultacie immobilizacji metali ciężkich, takich jak cynk, ołów i kadm, a tym samym wspomaga proces odnowy szaty roślinnej na terenach zdegradowanych (Mench i in. 2010, Bolan i in. 2014). Ponadto, w wyniku zastosowania osadów ściekowych zwiększa się także retencja wody dostępnej dla roślin. Ma to szczególne znaczenie w przypadku gleb lekkich oraz gruntów przepuszczalnych i może w znacznym stopniu poprawiać procent wschodów nasion lub przyjęcie roślin wprowadzanych na rekultywowane tereny (Weber i in. 2007, Singh i Agrawal 2008). Suplementacja gleby substancjami humusowymi, takimi jak kwasy huminowe, jest również skuteczna, ponieważ są one kluczowymi składnikami żyzności gleby (Arjumend i in. 2015). Jednym ze źródeł kwasów huminowych jest węgiel brunatny, na bazie którego stworzono nawóz organiczny o nazwie handlowej Rekulter®. Zastosowanie tego preparatu znacznie zwiększa zawartość węgla organicznego i poprawia zdolności sorpcyjne podłoża, co powoduje unieruchomienie zanieczyszczeń i polepszenie jakości gleby (Maciejewska i Kwiatkowska 1998, Ciarkowska i in. 2017b). Jako polepszacz gleby o bardzo dobrych właściwościach proponuje się również odpady z plantacji *Beta vulgaris* L. (SBR). SBR jest produktem ubocznym zawierającym celulozę i drzewnik, otrzymanym w trakcie przygotowania bulw buraka cukrowego do ekstrakcji cukru. Materiał ten jest poddawany fermentacji przez odpowiednio dobrane izolaty grzyba *Aspergillus niger* Tiegh, w wyniku czego powstaje produkt organiczny bogaty w polisacharydy i łatwo dostępny fosfor. Jego pozytywny wpływ na efektywność fitoekstrakcji metali wiąże się z podwyższoną biomasą mikroorganizmów, zwiększoną aktywnością hydrolaz i oksydoreduktaz – enzymów glebowych, stymulacją wzrostu i rozwoju roślin, a także zwiększoną stabilnością agregatów glebowych. Jako źródło

węgla organicznego może również służyć melasa – produkt uboczny uzyskiwany w procesie produkcji cukru. Stwierdzono, że melasa korzystnie wpływa na namnażanie bakterii glebowych, zwiększa zawartość związków mineralnych i witamin w glebie, poprawiając jej jakość (Wiszniewska i in. 2016). Ponadto, do poprawy warunków wzrostu roślin wykorzystuje się odpady z przemysłu papierniczego, które wydatnie poprawiają retencję wodną i stosunek węgla do azotu w remediowanym podłożu, a także ograniczają biodostępność różnych toksycznych pierwiastków. W ostatnich dziesięcioleciach jako polepszacz glebowy o wysokiej wartości zastosowanie znalazł biowęgiel. Jest to stały produkt otrzymany w wyniku pirolizy biomasy odpadowej z produkcji rolnej i leśnej. Produkt ten może odgrywać ważną rolę jako adsorbent powierzchniowy ze względu na dużą mikroporowatość, dużą powierzchnię cząstek, wysokie wartości odczynu (pH) i dużą pojemność wymiany kationów. Jednakże, stosując biowęgiel, na skutek zmiany pH zanieczyszczonego podłoża w kierunku alkalicznego, występuje zjawisko sorpcji chemicznej metali ciężkich, co utrudnia jego zastosowanie w fitoekstrakcji, natomiast znacznie wzmacnia efektywność fitostabilizacji zanieczyszczonej matrycy.

Możliwości wykorzystania rodzimych gatunków roślin galmanowych w fitoremediacji na przykładzie *B. laevigata*

Ze względu na korzyści jakie niesie za sobą zastosowanie fitoremediacji, Autorki tego rozdziału w prowadzonych od wielu lat badaniach, starają się dobrać odpowiednie gatunki roślin zdolne do wzrostu na odpadach generowanych w trakcie flotacyjnego wzbogacania rud cynkowo-ołowiowych, a w efekcie doprowadzić do ich stabilizacji i zapoczątkowania procesów glebotwórczych. Uwagę poświęcają przede wszystkim rodzimym gatunkom, które spontanicznie pojawiają się w skażonych siedliskach. Do inicjacji eksperymentów prowadzonych w kulturach *in vitro*, bądź w formie doświadczeń wazonowych i polowych wykorzystują nasiona pozyskane z siedlisk naturalnych (Ciarkowska i Hanus-Fajerska 2008, Muszyńska i in. 2013a, Muszyńska i in. 2018a, b, Hanus-Fajerska

i in. 2019). Realizowane w pierwszej kolejności badania laboratoryjne z jednej strony przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmów przystosowawczych roślin do stresu metalicznego, z drugiej zaś umożliwiają wstępną selekcję gatunków przydatnych do bezpośredniego zastosowania na osadnikach poflotacyjnych i innych skażonych podłożach (Ciarkowska i Hanus-Fajerska 2008, Muszyńska i in. 2017, Muszyńska i in. 2018b, Muszyńska i in. 2019). Biorąc pod uwagę, że hałdowa populacja *B. laevigata* wykazuje tolerancję na podwyższone poziomy metali ciężkich, deficyt wody i składników odżywczych (Bemowska-Kařabun i in. – Rozdział 5, 6, niniejszy tom) gatunek ten wzbudził szczególne zainteresowanie. W pierwszym etapie pracy eksperymentalnej, z nasion *B. laevigata* pozyskanych z osobników rosnących na starych hałdach w okolicy Bolesławia (Ryc. 3A) założono aseptyczne kultury i przeprowadzono selekcję na pożywkach wzbogaconych w kombinacje metali ciężkich występujących w glebie hałd (Ryc. 3B–C) (Hanus-Fajerska i in. 2012, Muszyńska i Hanus-Fajerska 2012). Następnie uzyskane mikroorganizmy zaaklimatyzowano do uprawy szklarniowej (Ryc. 3D). Posłużyły one do założenia trzyletniego doświadczenia wazonowego (Ryc. 3E) i polowego (Ryc. 3F), w którym oceniano możliwości zastosowania tego gatunku do stabilizacji odpadów cynkowo-ołowionych (Ciarkowska i in. 2017a, Muszyńska i in. 2017). Pleszczotka górńska była uprawiana na odpadach poflotacyjnych (kontrola), a także na odpadach poflotacyjnych z dodatkiem nawozów mineralnych lub osadu ściekowego traktowanego jako polepszacz podłoża. Po trzech latach uprawy wazonowej, szczególnie w obecności osadów ściekowych, zaobserwowano w podłożu wzrost aktywności enzymów oraz poziomów składników odżywczych przy równoczesnym istotnym obniżeniu zawartości rozpuszczalnych form cynku i kadmu w podłożu (Ryc. 4). Zależności tej nie zanotowano w przypadku ołowiu (Ryc. 4), który tylko w niewielkim procencie swojej zawartości występuje w formach dostępnych dla roślin (Muszyńska i Labudda 2019). W ten sposób dowiedziono, że uprawa *B. laevigata* z dodatkiem osadów ściekowych może być skuteczną metodą stabilizacji odpadów o bardzo wysokich stężeniach metali i przyczynić się do poprawy jakości podłoża (Ciarkowska i in. 2017a).

Analogicznie do wyników uzyskanych w doświadczeniu wazonowym, podczas uprawy polowej na osadniku materiałów poflotacyjnych stwierdzono, że badany gatunek wzrasta prawidłowo na odpadach poflotacyjnych uzupełnionych odpowiednio nawozami mineralnymi lub osadem ściekowym (Ryc. 5). Potwierdziła to analiza kondycji roślin wyznaczona w oparciu o powszechnie uznawane wskaźniki zmian metabolicznych zachodzących w komórkach roślinnych pod wpływem czynników stresowych, takie jak przepływ energii przez fotosystem II (Fv/Fm, PI) oraz zawartość barwników fotosyntetycznych (Tabela 1). Chociaż rośliny pleszczotki górskiej uprawiane na podłożu z osadem osiągnęły najwyższą aktywność fotosyntetyczną spośród badanych obiektów, w późniejszych fazach wzrostu były znacznie bardziej podatne na stropy abiotyczne np. temperaturowy lub związany z intensywnością światła (Muszyńska i in. 2017). Niemniej, pozostawało to bez wpływu na ich zdolność do regeneracji w kolejnych latach uprawy. Jako sukces można zatem odnotować potwierdzenie na drodze eksperymentu polowego, że uprawa pleszczotki górskiej, w celu uzyskania pokrywy roślinnej na terenie krańcowo zdegradowanym, stanowi potencjalną możliwość przyspieszenia sukcesji roślinnej i zapoczątkowania procesu tworzenia się gleby.

Perspektywa stosowania biologicznych metod oczyszczania środowiska

Oczyszczanie środowiska za pomocą roślin lub inne biologiczne działania limitujące rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń mogą być wykorzystywane jako odrębne techniki lub też stanowić uzupełnienie tradycyjnych sposobów remediacji. W odróżnieniu od metod konwencjonalnych, w przyjaznej dla środowiska technologii fitoremediacji zwykle nie stosuje się dodatkowych związków ekstrahujących metale, co znacznie ogranicza powstawanie zanieczyszczeń wtórnych (Mench i in. 2010). Ponadto, usuwanie toksyn przez rośliny wiąże się z poprawą struktury podłoża, zwiększeniem różnorodności składu gatunkowego, liczebności i aktywności mikroorganizmów glebowych (co korzystnie wpływa na żyzność gleby) oraz zmniejszeniem procesów erozji powierzchniowej (Ciarkowska i in.

2017a). Fitoremediacja nie wymaga specjalistycznego sprzętu, a techniki są prostsze w wykonaniu w porównaniu do fizycznych i chemicznych metod remediacji (Ali i in. 2013). Bardzo ważną zaletą aplikacji metod biologicznych są ich niskie koszty. Dla przykładu, oczyszczenie 1 m³ gleby metodami fizycznymi, może kosztować od około 100 do około 500 USD, podczas gdy fitoekstrakcja tej samej powierzchni to wydatek około 50 USD (Gwóźdź i Kopyra 2003). Dodatkowo, ta „zielona technologia” umożliwiła szybką poprawę walorów estetycznych środowiska, dzięki czemu cieszy się dużą akceptacją społeczną (Vaverková i Adamcová 2018).

Chociaż fitoremediacja stanowi obiecującą metodą oczyszczania terenów skażonych metalami ciężkimi, technologia ta napotyka na szereg ograniczeń. Jednym z podstawowych jest stosunkowo długi czas oczyszczania, który dla jonów metali ciężkich może wynosić od kilku do kilkunastu lat (Jabeen i in. 2009). Co więcej, podłoże może zostać oczyszczone jedynie do głębokości penetracji przez system korzeniowy, który u roślin zielnych osiąga maksymalnie długość 120 cm, zaś u drzew nawet 7 m (Tordoff i in. 2000, Singh i Santal 2015). Kolejne trudności stwarza opracowanie sposobu oczyszczania podłoża skażonych mieszaniną kilku związków, gdzie może mieć miejsce ich wzajemna interakcja. Odbudowę biologiczną skażonego terenu utrudniają także niekorzystne dla rozwoju roślin warunki środowiska, takie jak silne nasłonecznienie, susza, niska zawartość składników pokarmowych oraz wysoka koncentracja metali ciężkich w podłożu. Czynniki te istotnie wpływają na skuteczność odtworzenia i co ważniejsze trwałego utrzymania zwartej pokrywy roślinnej podczas fitostabilizacji, a także na szybkość usuwania zanieczyszczeń w przypadku fitoekstrakcji. Poważną przeszkodę stanowi także niewielka liczba roślin zdolnych do wzrostu w obecności wysokich stężeń toksycznych związków, jak również zbyt niska odporność zastosowanych roślin, wynikająca z błędów popełnianych podczas niewłaściwego doboru gatunków roślin do fitoremediacji. Innym niebezpieczeństwem jest możliwość przedostania się zakumulowanych w roślinach związków do dalszych

ogniw łańcucha pokarmowego, co w konsekwencji może doprowadzić do skażenia sieci troficznych. W wielu przypadkach nieznaną jest również kierunek przemian biochemicznych zakumulowanych w tkankach substancji toksycznych, a tym samym biologiczne właściwości oraz potencjalna szkodliwość powstałych metabolitów (Mench i in. 2010).

Istniejące trudności w stosowaniu fitoremediacji na szeroką skalę pozwalają dostrzec jak wiele aspektów pozostaje jeszcze do wyjaśnienia w tej nieustająco rozwijającej się „zielonej technologii”. Obecnie prowadzi się badania nakierowane na selekcję gatunków o szczególnych predyspozycjach do zastosowania na terenach zdegradowanych chemicznie. Właściwe podejście zakłada wykorzystanie lokalnie występujących roślin, które na drodze mikroewolucji przystosowały się do egzystencji na obszarach skażonych chemicznie (Tordoff i in. 2000, Muszyńska i in. 2013a, Panday i in. 2015, Ciarkowska i in. 2017a, Muszyńska i Hanus-Fajerska 2017). W doskonaleniu technik fitoremediacji pomocne są także różnorodne metody biotechnologiczne. W tym zakresie, techniki kultur *in vitro* stanowią innowacyjne narzędzie stosowane w badaniach zarówno o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym (Wiszniewska i in. – Rozdział 8, niniejszy tom). Z jednej strony, kultury *in vitro* umożliwiają tworzenie układów modelowych pozwalających lepiej zrozumieć mechanizmy metaboliczne zaangażowane w pobieranie i detoksykację metali ciężkich, z drugiej zaś pozwalają na intensywne rozmnażanie cennych genotypów przydatnych do bezpośredniego zastosowania w fitoremediacji (Doran 2009, Rai i in. 2011, Wiszniewska i in. 2017, Muszyńska i in. 2018a, b, Hanus-Fajerska in. 2019). Jednocześnie metody biotechnologiczne poprzez selekcję *in vitro* lub modyfikacje genetyczne ułatwiają uzyskiwanie roślin o nowych, pożądanym cechach, co przyczynia się do stopniowego pokonywania kolejnych ograniczeń fitoremediacji. Biorąc zatem pod uwagę rozwój technik badawczych i ogólnosiwiatowy trend integracji wiedzy naukowej z praktyką należy mieć nadzieję, że wiele pytań o komercyjne zastosowanie roślin do oczyszczania środowiska znajdzie odpowiedź w niedalekiej przyszłości.