

Joanna Augustynowicz*, Anna Kołton*, Agnieszka Baran**,
Adam Świdorski***

**BIOREMEDIACJA METALI W KONTEKŚCIE STANU
FIZJOLOGICZNEGO ROŚLIN**

**BIOREMEDIATION OF METALS IN THE CONTEXT OF PHYSIOLOGICAL
STATUS OF PLANTS**

Słowa kluczowe: *Callitriche*, chrom, fenole, fitoremediacja, fluorescencja chlorofilu.

Key words: *Callitriche*, chromium, phenols, phytoremediation, chlorophyll fluorescence.

*The aim of the study was to analyze the correlation between the physiological state of water starwort (*Callitriche cophocarpa*) and its ability to chromium ions phytoremediation. The species belongs to the evergreen aquatic macrophytes with unusual ability to accumulate the element (Augustynowicz et al., Chemosphere 2010). In the present study the relationship between the level of Cr accumulation after incubation in a solution of Cr(VI), photosynthetic activity and phenolic plant metabolism was investigated. The highest level of Cr accumulation, reaching up to 9450 mg kg⁻¹ of dry weight, was measured in samples collected during the summer. At the same time, these samples exhibited Cr(VI)-induced, significant decrease in activity of the light phase of photosynthesis, determined via fluorescence of chlorophyll a measurements. The analysis of phenolic compounds in plant material collected during the summer and treated with Cr(VI), did not show statistically significant differences in comparison to control samples. Plants collected in the autumn compared to the ones collected in the summer, accumulated less than 3-fold of Cr. The total level of phenolic compounds in control samples collected in the autumn, were also significantly lower in respect*

* Dr Joanna Augustynowicz, dr Anna Kołton – Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin, Wydział Ogrodniczy, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków; tel.: 12 662 51 99; e-mail: augustyn@ogr.ur.krakow.pl, kołtona@ogr.ur.krakow.pl

** Dr Agnieszka Baran – Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków; e-mail: Agnieszka.Baran@ur.krakow.pl

***Dr Adam Świdorski – Katedra Biochemii, Wydział Ogrodniczy, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków; e-mail: aswider@ogr.ur.krakow.pl

to the summer ones. However, plants derived from the autumn season showed significantly high levels of Cr(VI)-induced phenolic compounds. Furthermore, due to detailed HPLC analysis, the highest increase of phenolic compounds in these samples was related to the pool of free flavonoids and their glycosides. Stimulation of the Cr(VI)-induced synthesis of phenols in plants collected in autumn was correlated with high resistance of photosynthetic apparatus to Cr(VI) influence. High, negative correlation between the activity of photosynthetic apparatus and accumulation of the element ($r = -0.97$) was observed. The role of phenolic compounds in the Cr accumulation by *C. cophocarpa* is difficult to clearly assess and requires further examination.

1. WPROWADZENIE

Metale należą do najbardziej trwałych, migrujących zanieczyszczeń środowiska naturalnego. Zanieczyszczenia związkami chromu stanowią poważny problem środowiskowy na świecie (USA, Indie, Chiny), a na obszarach naszego kraju obejmują uprzemysłowiony Śląsk oraz – bardzo dotkliwie – południową Małopolskę. Z wykorzystaniem naturalnej rudy chromowej syntetyzowanych jest kilkaset różnorodnych związków Cr stosowanych w przemyśle – m.in. w metalurgii, galwanotechnice, garbowaniu skór, produkcji barwników i środków do impregnacji drewna.

Polska jest znaczącym europejskim producentem, wykorzystywanych przemysłowo związków Cr. W konsekwencji działalności człowieka do środowiska naturalnego przedostają się często bardzo duże ilości tego pierwiastka. W skali światowej roczna emisja Cr do rzek i mórz wynosi ok. trzydziestu pięciu tysięcy ton, co stanowi 10% jego wydobycia [Kabata-Pendias i Mukherjee 2007, Kabata-Pendias i Pendias 1999].

Cr występuje na kilku stopniach utlenienia, z czego najbardziej stabilne i powszechne są III i VI. Te dwie formy różnią się znacząco własnościami fizykochemicznymi i rolą fizjologiczną. Cr(III) występuje w postaci kationów (np. CrOH^{2+}), jest słabiej rozpuszczalny, ulega łatwemu wytrącaniu i koordynacyjnemu wiązaniu przez organiczne sorbenty gleby i osadów dennych. Cr(III) jest niezbędnym mikroelementem w diecie człowieka, biorącym udział w budowie tzw. czynnika tolerancji glukozy (z ang. *Glucose Tolerance Factor* – *GTF*).

Cr(VI) ma postać anionów (np. $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), jest łatwo rozpuszczalny i słabo sorbowany. Ze względu na wysoki potencjał redox wykazuje niezwykle silne własności utleniające, równocześnie ma łatwość do penetracji błon biologicznych. Cr(VI) wywiera kancerogenny wpływ na człowieka i zwierzęta [Kotaś i Stasicka 2000].

Fitoremediacja metali w naturalnych systemach wodnych, oparta na wodnych roślinach naczyniowych (makrofity), jest strategią konkurencyjną w porównaniu z innymi metodami bioremediacyjnymi, wykorzystującymi żywą lub martwą (biosorpcja) biomasę mikroorganizmów pro- i eukariotycznych. Wysoki potencjał fitoremediacyjny makrofitów wodnych, w szczególności występujących w strefach klimatu gorącego, jest w literaturze dobrze udo-

kumentowany [Dhote i Dixit 2009]. Jakkolwiek, co należy podkreślić, dane literaturowe dotyczące fitoremediacji Cr, w stosunku do innych metali ciężkich, są stosunkowo ograniczone. *Callitriche cophocarpa* jest kosmopolitycznym, zimozielonym makrofitem, którego niezwykle zdolności do akumulacji chromu zostały ostatnio odkryte i opisane przez autorów niniejszej pracy. Zachowując porównywalny z kontrolnymi status fizjologiczny, rośliny badanego gatunku były w stanie zakumulować ponad 1000 mg Cr na kg suchej masy, po inkubacji w niezwykle toksycznej i mobilnej postaci tego pierwiastka Cr(VI) [Augustynowicz i in. 2010]. Jest to poziom, który zgodnie z definicją, w warunkach naturalnych, odpowiadałby hiperakumulacji tego metalu [Reeves 2006, Baker i Brooks 1989]. Równocześnie, autorzy projektu wykazali bardzo znaczący i wciąż jeszcze niewysycony poziom biosorpcji Cr(III) przez pędy rośliny. Osiągnął on wartość ok. 30 000 mg/kg suchej masy [Augustynowicz i in. 2011].

2. CEL BADAŃ

Prezentowane badania miały na celu znalezienie korelacji pomiędzy stanem fizjologicznym *Callitriche cophocarpa*, jej zdolnością do fitoremediacji Cr(VI) a porą roku. Wnioski z badań będą mogły stanowić wskazówkę dotyczącą odpowiedniego doboru materiału roślinnego przy jego eksploatacji w biotechnologii zanieczyszczonych wód.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał do badań i inkubacja w roztworach Cr(VI)

Callitriche pobierano wiosną 2010 i 2011 r. oraz latem i jesienią 2011 r. z rzeki Dłubni – Małopolska: 50°16'N/19°56'E. Rośliny dokładnie oczyszczano i wielokrotnie płukano wodą wodociągową, a na koniec – destylowaną. Roztwór do inkubacji stanowiła niezanieczyszczona woda rzeczna, pobrana z naturalnego stanowiska rośliny. Każdorazowo woda była filtrowana (filtry *Supelco* o średnicy porów 0,2 μm) w celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów i glonów. Skład wody został określony dzięki uprzejmości W. Knapa, w akredytowanym Laboratorium Hydrogeochemicznym AGH w Krakowie. Do oznaczeń wykorzystano spektrometr atomowy z detektorem masowym *ICP-MS* (ELAN 6100, Perkin Elmer) oraz metody miareczkowe. Przeciętna zawartość poszczególnych jonów [mg l^{-1}] wynosiła: 10,1 Na^+ , 4,6 K^+ , 111,7 Ca^{2+} , 13,7 Mg^{2+} , $5 \cdot 10^{-3}$ Fe^{2+} , $7 \cdot 10^{-3}$ Mn^{2+} , $1,8 \cdot 10^{-2}$ Zn^{2+} , $2 \cdot 10^{-3}$ Cu^{2+} , 10^{-3} Mo^{6+} , 32,4 Cl^- , 32,9 SO_4^{2-} , 344,0 HCO_3^{2-} , 8,2 NO_3^{2-} , 0,06 PO_4^{3-} , 0,20 BO_3^{3-} . Zawartość metali ciężkich takich jak Pb, Hg, Cd i Cr nie przekraczała 1 $\mu\text{g l}^{-1}$. Przewodnictwo elektryczne wody wynosiło 0,63 mS cm^{-1} , pH = 7,80 a Eh = 256 mV. Roztwory z Cr(VI) przygotowywano przez rozpuszczenie w wodzie soli $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (POCh), aby uzyskać 1 mM (52 mg l^{-1}) lub 2 mM (104 mg l^{-1}) stężenie pierwiastka, odpowiednio do testów metabolicznych oraz akumulacyjnych. pH wody obniżało się wskutek dodania Cr(VI) i wynosiło ok. 7,1 lub 6,6, odpowiednio dla roztworu 1 i 2 mM.

1,5 g roślin inkubowano w 150 ml roztworu przez 5 dni w fitotronie, w warunkach zbliżonych do naturalnych: 16 godz. światła 35 μmol fotonów na $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LF 36W/54, Piła) na 8 godz. ciemności, 25°C.

3.2. Analiza zawartości Cr

Stężenie Cr oznaczano dzięki metodzie emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem plazmowym (*ICP-OES*; Perkin Elmer Optima 7300 DV lub Prodigy Teledyne Leeman Labs) względem wzorców (Merck). Po inkubacji rośliny dokładnie płukano w wodzie destylowanej, suszono przez 24 godz. w 105°C, a następnie mineralizowano poprzez łagodne ogrzewanie w 65-procentowym HNO_3 . Zawartość Cr(VI) w roztworach oznaczano różnicowo po wytrąceniu i odsączeniu Cr(III) zgodnie z normą PN-77/C-04604/08.

3.3. Pomiary fluorescencji chlorofilu

Fluorescencja chlorofilu rejestrowana była dzięki wykorzystaniu spektrofluorymetru Handy-PEA (Hansatech) w oparciu o standardową procedurę aparatu. Przed pomiarem liście adaptowano w ciemności przez 0,5 godz. Fluorescencję indukowano światłem czerwonym: $\lambda_{\text{max}}=650\text{nm}$, 1500 μmol fotonów na $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Następnie wyznaczano parametr Fv/Fm (Fv – fluorescencja zmienna, Fm – fluorescencja maksymalna), czyli maksymalną fotochemiczną wydajność fotosystemu II.

3.4. Oznaczanie związków fenolowych

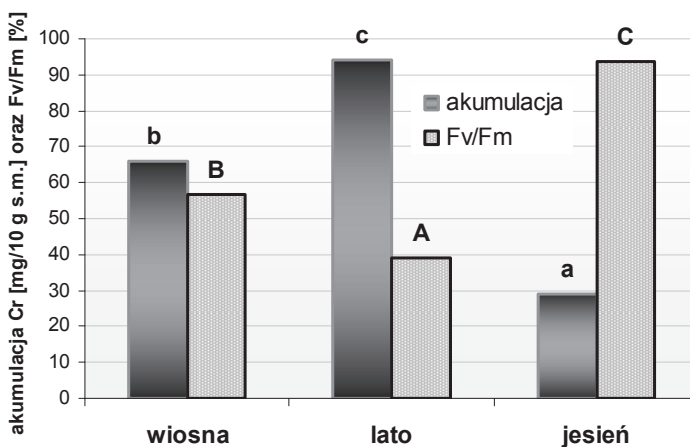
Związki fenolowe analizowano metodą spektrometrii *UV-Vis* oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*HPLC*). 0,1 g tkanki mrożono w ciekłym azocie, a następnie homogenizowano w 80-procentowym metanolu (POCh) w wodzie przez ok. 5 minut. Uzyskane w ten sposób homogenaty wirowano (5 min, 4800 g), a supernatant zbierano. Do osadu dodawano roztworu metanolu (jw.), wytrząsano i powtórnie wirowano. W sumie procedurę powtarzano 3-krotnie. Ostatecznie, nadsącz uzupełniano do 10 lub 20 ml roztworem metanolu (j/w). Analizę *HPLC* przeprowadzono na chromatografie Shimadzu LC-10AS, wyposażonym w detektor SPD-10AV ($\lambda=265$ i 325 nm), zgodnie z protokołem opisanym przez Świdarskiego i in. (2004). Wykorzystano kolumnę LiChrospher 125 mm RP18 (5 μm) oraz gradient woda-metanol (10–100%), z dodatkiem H_3PO_4 . Prędkość fazy rozpuszczonej wynosiła 1,6 ml min^{-1} , a objętość próbki – 20 μl . Analizę spektrofotometryczną (spektrometr Hitachi *UV-Vis* U-2900) przeprowadzono metodą opisaną przez Fukumoto i Mazza [2000]. Zawartość fenoli była obliczona na podstawie pomiarów absorbancji przy 280, 320, 360 i 520 nm. Do określenia poszczególnych klas fenoli wykorzystano wzorce: kwasu chlorogenowego i kawowego (fenylopropanoidy), cyjanidyny (an-

tocyjany), rutynozydu kwercetyny (glikozydy flawonoidów) oraz kwercetyny i kemferolu (wolne flawonoidy) (Sigma).

4. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Wszystkie przedstawione wyniki zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem modułu ANOVA oraz NIR-Fishera, przy założonym poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Akumulacja Cr przez pędy *Callitriche* inkubowane w roztworze Cr(VI) różniła się istotnie w zależności od pory roku, w której wykonywano testy. Najwyższą zawartość metalu w tkankach wykazano dla obiektów pochodzących z lata. Zawartość ta dochodziła do $9450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy i ponad 3-krotnie lub mniej więcej 1,5-krotnie przewyższała poziom akumulacji Cr przez rośliny testowane, odpowiednio, jesienią lub wiosną (rys. 1). Po 5 dniach inkubacji roślin z Cr określano w roztworze zawartość jonów trójwartościowych, powstających w wyniku redukcji: Cr(VI) – Cr(III). Jako kontrola służyły roztwory o takim samym wyjściowym stężeniu jonów Cr(VI), bez roślin. Wy tłumaczeniem obecności Cr(III) w roztworze kontrolnym jest wpływ naturalnie występujących w wodzie rzecznej reduktorów, takich jak np. Fe^{2+} . Procentowa zawartość Cr(III) w stosunku do całkowitej zawartości Cr w roztworze, po 5 dniach inkubacji, wynosiła 18,1 lub 18,2, odpowiednio: w roztworze kontrolnym i zawierającym rośliny.



Rys. 1. Akumulacja chromu, $\text{mg}/10 \text{ g s.m.}$, w pędach *Callitriche cophocarpa* oraz ich aktywność fotosyntetyczna mierzona jako fotochemiczna wydajność fotosystemu II (Fv/Fm) po 5 dniach inkubacji w roztworze Cr(VI). Fv/Fm wyrażono względem kontroli (100% = 0,8); $n = 4$ lub 8

Fig. 1. Chromium accumulation [$\text{mg}/10 \text{ g d.m.}$] by shoots of *Callitriche cophocarpa* and their photosynthetic activity measured as a photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm) after 5-day incubation in the solution of Cr(VI). Fv/Fm as % of control (100% = 0,8); $n = 4$ lub 8

Wyniki przeprowadzonych testów wskazują na to, że fitostabilizacja polegająca na redukowaniu Cr(VI) do Cr(III) poza organizmem rośliny i dalszym jego wytrącaniu z roztworu nie jest strategią fitoremediacyjną dla badanego gatunku; jakkolwiek, co wykazano we wcześniejszych pracach [Augustynowicz i in. 2009], roślina ta ma zdolność do redukcji jonów Cr(VI) zachodzącą w obrębie tkanek.

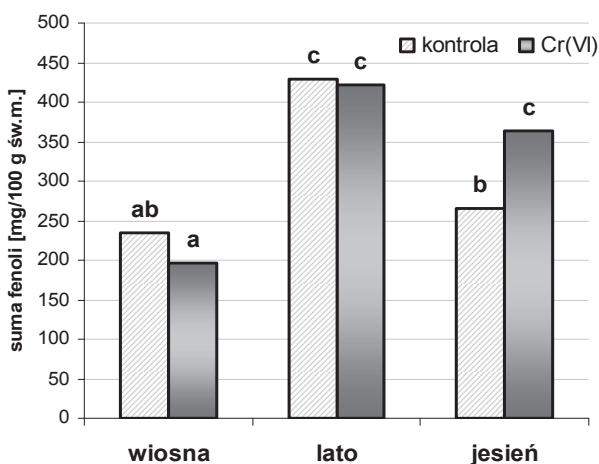
Badania aktywności fotochemicznej PSII, oparte na pomiarze parametru Fv/Fm, pozwoliły na stwierdzenie znaczących różnic we wrażliwości fotosystemu II, a co za tym idzie – świetlnej fazy fotosyntezy, na stres wywołany obecnością Cr u roślin pochodzących z różnych pór roku. W badaniach wykorzystano metodę pomiaru fluorescencji chlorofilu *a*, znajdującej szerokie zastosowanie w nieinwazyjnym monitorowaniu stanu fizjologicznego roślin poddanych wpływowi różnorodnych stresów abiotycznych [Kalaji i Łoboda 2010].

Największe zaburzenia w pierwotnych reakcjach fotosyntezy stwierdzono u roślin kolekcjonowanych latem – wartość Fv/Fm spadała tu do poziomu ok. 0,312, co odpowiada ok. 39% względem kontroli (Fv/Fm dla kontroli \cong 0,8). Najwyższą fotochemiczną odporność PSII wykazano dla prób jesiennych, gdzie wartość parametru Fv/Fm spadała jedynie o 0,050, czyli o 6% w stosunku do kontroli. Rośliny wiosenne wykazywały pośrednią podatność zaburzeń jasnej fazy fotosyntezy na stres wywołany jonami chromu (rys. 1). Wykazano również wyraźną ujemną korelację ($r = -0,97$) pomiędzy aktywnością aparatu fotosyntetycznego a poziomami akumulacji Cr przez badany gatunek. Najwyższą zawartość metalu w tkankach roślin zmierzono dla obiektów letnich, które jednocześnie cechowały się najniższymi wartościami fotochemicznej wydajności fotosystemu II.

Wpływ metali ciężkich na jakość aparatu fotosyntetycznego, w tym roślin wodnych, jest w literaturze szeroko udokumentowany [Baumann i in. 2009, Lage-Pinto i in. 2008]. Oddziaływania metali opisywane są na wielu poziomach organizacji i metabolizmu komórki. Na poziomie molekularnym ich obecność może zaburzać świetlną fazę fotosyntezy poprzez wpływ na m.in.: enzymatyczne szlaki syntezy barwników fotosyntetycznych, strukturę i funkcję fotosystemów, w tym kompleksu uwalniającego tlen (OEC) oraz, bezpośrednio, transport elektronów [praca przeglądowa Myśliwa-Kurdziel i in. 2004]. Najwyższa podatność PSII na stres wywołany obecnością Cr(VI) u roślin rosnących latem jest związana prawdopodobnie z ich najwyższą aktywnością metaboliczną. Jak wykazano, pędy rosnące latem są również w stanie zakumulować najwięcej metalu. Z kolei, wysoka odporność świetlnej fazy fotosyntezy na obecność Cr(VI) może wynikać ze spowolnienia metabolizmu rośliny, gdyż jednocześnie rośliny testowane jesienią akumulują go najmniej. Mechanizm akumulacji Cr(VI), który w systemach wodnych występuje jedynie w postaci anionów, wymaga nakładów energii i pozostaje w ujemnej korelacji z transportem anionów siarczanowych [Appenroth i in 2008, Kaszycki i in. 2005]. To właśnie uzależnienie transportu Cr(VI) od aktywności metabolicznej roślin może być wytłumaczeniem badanego zjawiska.

Kolejnym etapem pracy była analiza zawartości związków fenolowych. Fenole znane są ze swoich antyutleniających własności i zdolności do zmiatania wolnych rodników, tym

samym przeciwdziałając skutkom stresu wywołanego metalami ciężkimi [Lavid i in. 2001a]. Dodatkowo, mogą również brać udział w akumulacji metali poprzez ich koordynacyjne wiązanie [Lavid i in. 2001b]. Analiza związków fenolowych wykazała, iż najwyższa zawartość w odniesieniu do ich sumy (rys. 2) oraz niezależnie każdej z klas: fenylpropanoidów, flawonoli i antocyjanów (dane nieprezentowane) występuje w roślinach kolekcjonowanych latem. Jednocześnie, w okresie lata, w roślinach poddanych działaniu Cr(VI) nie obserwowano podwyższenia ich zawartości (rys. 2). W przeciwieństwie do prób letnich, rośliny zebrane jesienią, w odpowiedzi na wpływ Cr(VI), reagowały znaczącym podwyższeniem sumy zawartości fenoli. Jakkolwiek, bezwzględna zawartość fenoli w próbach kontrolnych była w tym wypadku niższa niż w letnich. Dokładne analizy chromatograficzne wykazały, iż w opisanych wyżej próbach, obecność Cr(VI) indukowała głównie powstawanie fenoli z klasy flawonoidów, w tym zarówno wolnych, jak i ich glikozydów (rys. 3).

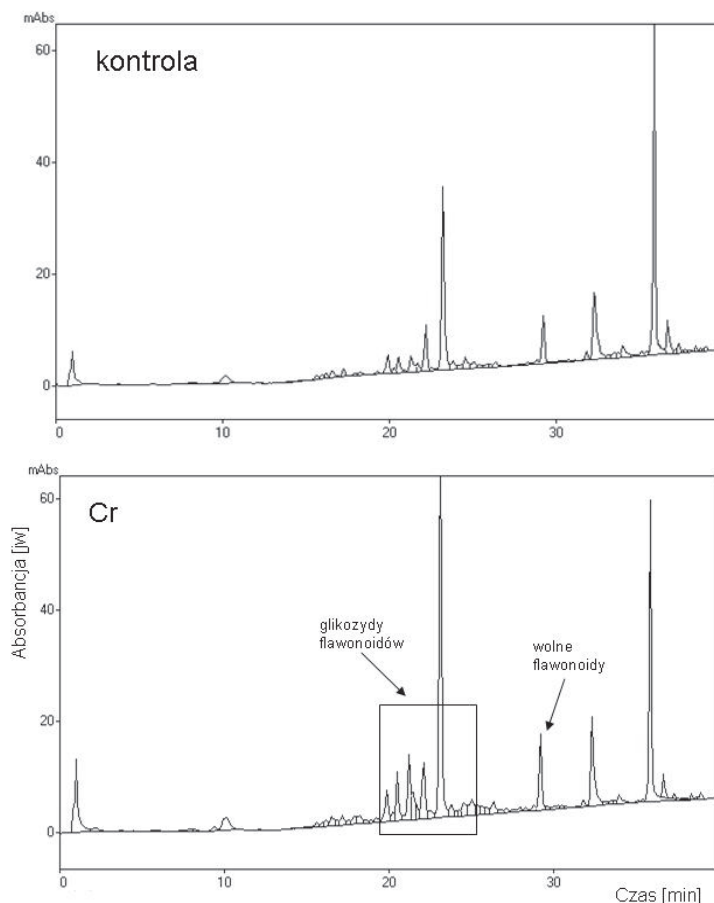


Rys. 2. Całkowita zawartość związków fenolowych w pędach *Callitriche cophocarpa*, mg/100 g św.m.; n = 4 lub 6

Fig. 2. Total amount of phenolic compounds in shoots of *Callitriche cophocarpa*, mg/100 g f.w.m.; n = 4 lub 6

Wyniki prezentowanych badań nie są jednoznaczne w interpretacji. Działanie Cr(VI) na rośliny, ze względu na jego niezwykle silne własności utleniające, skutkuje powstaniem reaktywnych form tlenu (ROS) prowadzących do peroksydacji lipidów błonowych [Dhir i in. 2009, Shanker i in. 2005]. Fenole, jak już wspomniano, wykazują zdolność do neutralizacji ROS, jak również do koordynacyjnego wiązania kationów metali. W przeprowadzonych doświadczeniach mogłyby to być kationy Cr(III), których tworzenie w tkankach *Callitriche*, na skutek redukcji Cr(VI), zostało udokumentowane [Augustynowicz i in. 2009]. Można przypuszczać, iż badane rośliny, w zależności od fazy rozwoju i aktywności metabolicznej, wy-

korzystują inne mechanizmy w odpowiedzi na stres. W literaturze opisano różnice w zawartości związków fenolowych u roślin wodnych, wynikające ze zmian warunków środowiska zewnętrznego [Larue i in. 2010]. Fenole, a w szczególności flawonoidy, mogłyby pełnić ochronne funkcje w okresie obniżonej aktywności metabolicznej – stymulacja indukowanej Cr(VI), syntezy fenoli u roślin kolekcjonowanych jesienią była skorelowana z wysoką odpornością aparatu fotosyntetycznego. Aby jednoznacznie wyjaśnić udział fenoli w odpowiedzi badanego gatunku na stres wywołany jonami Cr(VI), konieczne są dalsze badania.



Rys. 3. Przykładowe chromatogramy (HPLC) z maksimami odpowiadającymi glikozydom flawonoidów (czas retencji 20–25 min) oraz wolnym flawonoidom (czas retencji 25–30 min) indukowanymi obecnością Cr(VI) u roślin zebranych jesienią

Fig. 3. The example chromatographs (HPLC) with maxima reflecting flavonoid glycosides (retention time 20–25 min) and free flavonoids (retention time 25–30 min) induced by Cr(VI) in plants collected in autumn

Praca była częściowo finansowana z indywidualnego stypendium J. Augustynowicz, udzielonego przez Rektora UR w Krakowie, z Własnego Funduszu Stypendialnego dla Pracowników Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

PIŚMIENNICTWO

- APPENROTH K.J., LUTHER A., JETSCHKE G., GABRYŚ H. 2008. Modification of chromate toxicity by sulphate in duckweeds (*Lemnaceae*). *Aquat. Toxicol.* 89, 167–171.
- AUGUSTYNOWICZ J., GROSICKI M., HANUS-FAJERSKA E., LEKKA M., WALOSZEK A., KOŁOCZEK H. 2010. Chromium(VI) bioremediation by aquatic macrophyte *Callitriche cophocarpa* Sendtn. *Chemosphere* (79): 1077–1083.
- AUGUSTYNOWICZ J., KOSTECKA-GUGAŁA A., KOŁOCZEK H. 2009. Analiza kinetyki redukcji Cr(VI) przez wodne gatunki fitoremediatorów. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* (41): 210–219.
- AUGUSTYNOWICZ J., KYZIOŁ-KOMOSIŃSKA J., SMOLEŃ S., WALOSZEK A. 2011. Binding capacity of chromium ions to *Callitriche cophocarpa* (water starwort). *Water Res.* (przedstawiono do druku).
- BAKER A., BROOKS R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* (1): 81–126.
- BAUAMNN H.A., MORRISON L., STENGEL D.B. 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol. and Environ. Safety* (72): 1063–1075.
- DHIR B., SHARMILA P., SARADHI P.P., NASIM S.A. 2009. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicol. and Environ. Safety* (72): 1790–1797.
- DHOTE S., DIXIT S. 2009. Water quality improvement through macrophytes – a review. *Environ. Monit. Assess* (152): 149–153.
- FUKUMOTO L.R., MAZZA G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* (48): 3597–3604.
- KABATA-PENDIAS A., MUKHERJEE A.B. 2007. Trace Elements from Soil to Human. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1999. Biogeochemia Pierwiastków Śladowych. PWN, Warszawa.
- KALAJI M.H., ŁOBODA T. 2010. Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- KASZYCKI P., GABRYŚ H., APPENROTH K., JAGLARZ A., SĘDZIWIY S., WALCZAK T., KOŁOCZEK H. 2005. Exogenously applied sulphate as a tool to investigate transport and reduction of chromate in the duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Plant, Cell and Environ.* (28): 260–268.

- KOTAŚ J., STASICKA Z. 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Poll.* (107): 263–283.
- LAGE-PINTO F., OLIVEIRA J.G., DA CUNHA M., SOUZA C.M.M., REZENDE C.E., AZEVEDO R.A., VITÓRIA A.P. 2008. Chlorophyll *a* fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environ. and Exp. Bot.* (64): 307–313.
- LAVID N., SCHWARTZ A., LEWINSOHN E., TEL-OR E. 2001a. Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (*Menyanthaceae*) and *Nymphaeae* (*Nymphaeaceae*). *Planta* (214): 189–195.
- LAVID N., SCHWARTZ A., YARDEN O., TEL-OR E. 2001b. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* (212): 323–331.
- LARUE C., KORBOULEWSKY N., WANG R., MÉVY J.P. 2010. Depollution potential of three macrophytes: Exudated, wall-bound and intracellular peroxidase activities plus intracellular phenol concentrations. *Bioresource Technology* (101): 7951–7957.
- MYŚLIWA-KURDZIEL B., PRASAD M.N.V., STRZAŁKA K. 2004. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. [in:] *Heavy Metal Stress in Plants: from Biomolecules to Ecosystems*, wyd. II. Springer Berlin Heidelberg: 146–181.
- PN-77/C-04604/08: Badania zawartości chromu. Oznaczenie chromu sześciowartościowego (Cr⁶⁺) i trójwartościowego (Cr³⁺).**
- REEVES R.D. 2006. Hyperaccumulation of trace elements by plants. [in:] *Phytoremediation of metal-contaminated soils*. Springer-Verlag: 25–52.
- SHANKER A.K., CERVANTES C., LOZA-TAVERA H., AVUDAINAYAGAM S. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* (31): 739–753.
- ŚWIDERSKI A., MURAS P., KOŁOCZEK H. 2004. Flavonoid composition in frost-resistant *Rhododendron* cultivars grown in Poland. *Sci Hort.* (100): 139–151.