

Załącznik 2

# AUTOREFERAT

---

dr Aneta Piechalak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Biologii  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Zakład Biologii Genomu

Poznań 2017

1. **Imię i nazwisko:** Aneta Piechalak

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe — z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

1996 r. - magister biologii, Zakład Wirusologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotor: Prof. dr hab. Anna Goździcka Józefiak

2002 r. -doktor nauk biologicznych w zakresie biologia - biochemia, Zakład Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł rozprawy „Mechanizmy detoksykacji jonów ołowiu w roślinach motylkowatych w celu ich wykorzystania w procesie fitoremediacji”. Promotor: Prof. dr hab. Barbara Tomaszewska

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

01.09.2017 - obecnie - adiunkt, Zakład Biologii Genomu, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

01.01.2003-31.08.2017- adiunkt; Zakład Biochemii, Wydział Biologii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego obejmuje cykl siedmiu prac tematycznych przedstawionych pod wspólnym tytułem:

**Mechanizmy akumulacji i tolerancji metali u roślin motylkowych**

Ich łączny współczynnik IF wynosi **8,832<sup>1</sup>**; sumaryczna liczba punktów MNiSW - **159<sup>2</sup>**.

1. Impact factor (IF) zgodny z rokiem opublikowania.

2. Punktacja zgodnie z Wykazem czasopism naukowych aktualnym dla roku opublikowania artykułów

Sześć artykułów to prace eksperymentalne, z czego trzy zostały opublikowane w czasopismach z listy *Journal Citation Reports (JCR)*. W pracach figuruję pierwszy lub kolejny autor, który wywarł jednak zasadniczy wpływ na jej powstanie (włączając w to autorstwo całej koncepcji badań zamieszczonych w publikacji).

**A1. Piechalak A.,** Tomaszewska B., Barałkiewicz D. Enhancing phytoremediation ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry* 2003, 64: 1239-1251.

[IF 1,889; pkt MNiSW 35]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i poprowadzeniu hodowli grochu z dodatkiem ołowiu i liganda EDTA, przygotowaniu materiału, mineralizacji i wykonaniu badań techniką AAS co pozwoliło na analizę stopnia akumulacji i translokacji metalu w organach roślin, analizie wyników, przygotowaniu pierwszej wersji tekstu i rysunków oraz pracy nad kolejnymi poprawkami. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

**A2. Piechalak A.,** Tomaszewska B. Rola związków tiolowych w roślinach w warunkach stresu wywołanego metalami ciężkimi. *Postępy Biologii Komórki* 2004, 31(4), 717-733.

[pkt MNiSW 15]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu danych literaturowych i opracowaniu pierwszej wersji tekstu i rysunków dotyczącego przeglądu informacji na temat związków tiolowych i ich udziału w detoksykacji metali śladowych oraz w pracy nad jego kolejnymi wersjami. Mój udział procentowy szacuję na 90 %.

**A3. Piechalak A.,** M. Kózka, A. Małecka, K. Wasinkiewicz, D. Barałkiewicz, B. Tomaszewska. Influence of lead and cadmium ions on intensity of biosynthesis of phytochelatins in *Pisum sativum* plants. *Ecological Chemistry and Engineering*. 2005,12: 847-851. [pkt MNiSW 15]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i poprowadzeniu hodowli grochu z dodatkiem metali śladowych, pomiarów Indeksu Tolerancji i biomasy, przygotowaniu materiału i badań techniką HPLC pozwalająca na analizę zawartości fitochelatyn w traktowanych roślinach, zebraniu literatury i napisaniu pierwszej wersji tekstu i wszystkich rysunków oraz pracy nad kolejnymi wersjami tekstu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

**A4.** Barałkiewicz D., Kózka M., Kachlicki P., **Piechalak A.,** Tomaszewska B. Analysis of oxidized and reduced phytochelatins in pea and lupin plants using HPLC-MS<sup>n</sup>. *Intern J Environ Anal Chem*, 2008, 88: 979-988. [IF 1.114; pkt MNiSW 20]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego, zaplanowaniu i poprowadzeniu hodowli hydroponicznej roślin grochu i łubinu z dodatkiem metali śladowych, przygotowaniu materiału i przeprowadzeniu badań techniką HPLC ESI MS pozwalająca na analizę zawartości zredukowanych i utlenionych form fitochelatyn w traktowanych roślinach, opracowaniu wyników i przygotowaniu tabeli i rysunków, zebraniu literatury i napisaniu części tekstu dotyczącego fitochelatyn oraz w pracy nad jego kolejnymi wersjami. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

**A5. Piechalak A.,** Kozka M., Ciszewska L., Barańkiewicz D., Tomaszewska B. EDTA increased lead transport to the aboveground parts of *Phaseolus plants*. *Biologia Plantarum*. 2008, 52: 565-568. [IF 1.426; pkt MNiSW 25]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i poprowadzeniu hodowli fasoli z dodatkiem ołowiu i liganda EDTA, przygotowaniu materiału, mineralizacji i wykonaniu badań techniką AAS co pozwoliło na analizę stopnia akumulacji i translokacji metalu w organach roślin, opracowaniu wyników, napisaniu pierwszej wersji tekstu i rysunków oraz pracy nad kolejnymi poprawkami. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

**A6.** Barańkiewicz, M Kózka, **A Piechalak**, B Tomaszewska, P Sobczak. Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-MS to determination of Cd and Pb species and phytochelatins in pea (*Pisum sativum*). *Talanta*, 2009, 79: 493-498 [IF 3.290; pkt MNiSW 40]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego, współdziałanie w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i poprowadzeniu hodowli hydroponicznej roślin grochu z dodatkiem metali śladowych, przygotowaniu materiału do badań techniką HPLC MS i HPLC ICP MS pozwalające na analizę form skompleksowanych metali w traktowanych roślinach, zebraniu literatury i napisaniu części tekstu dotyczącej roli fitochelatyn. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

**A7. Piechalak A.,** Hanc A., Barańkiewicz D., Małecka A., Tomaszewska B. Influence of heavy metal ions at mineral nutrition on phytochelatin biosynthesis and growth of *Pisum sativum*. in "Progress on Heavy Metals in the Environment" 2012 editor: J Nriagu. MARALTEBOOKS, 289-297 [pkt MNiSW 4]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, prowadzeniu hodowli roślin grochu z dodatkiem metali śladowych, oznaczeniu wartości IT, przyrostu biomasy, analizie fitochelatyn metoda HPLC MS i poziomu mikro- i makroelementów z wykorzystaniem LA ICP MS, opracowaniu tekstu i rysunków oraz pracy nad kolejnymi wersjami. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

Impact Factor (IF) zgodny z rokiem opublikowania.

Punktacja zgodnie z Wykazem czasopism naukowych aktualnym dla roku opublikowania artykułów

Oświadczenia wszystkich współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie danej publikacji przedstawiono w załączniku 7

**c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Odnośniki literaturowe **A1-7** wyróżnione pogrubioną czcionką dotyczą publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zebranych w p. b. Pozostałe odnośniki literaturowe zamieszczono w podrozdziale „Literatura”.

Wstęp

Badania nad stresem od bardzo dawna stanowią przedmiot zainteresowania wielu badaczy na całym świecie. Pojęcie **stresu** jest trudne do zdefiniowania, ale generalizując można przyjąć że jest to *"fizjologiczna reakcja rośliny wywołana działaniem czynników środowiskowych, powodujących zakłócenie stanu równowagi"* (Gaspar i in. 2002).

Na każdą komórkę roślinną oddziałuje wiele różnych czynników stresowych, które ze względu na charakter możemy podzielić na czynniki **abiotyczne** czyli fizyczne i chemiczne jak promieniowanie UV, brak wody/zalanie, zasolenie, niska/wysoka temperatura oraz obecność metali śladowych oraz czynniki **biotyczne**, wywołane obecnością innych roślin, atakiem patogenów, aktywnością zwierząt i ludzi. Dotychczasowe badania prowadzone na roślinach poddanych działaniu czynników biotycznych lub abiotycznych wskazują, na obecność szeregu mechanizmów o charakterze uniwersalnych odpowiedzialne za tolerancję i adaptację roślin do warunków stresowych (Fujita i in., 2006, Slesak i in. 2007, Suzuki i in. 2014).

**Metale śladowe**, ze względu na powszechność występowania, są jednym z najczęściej badanych czynników stresu abiotycznego. Metale są naturalnymi składnikami środowiska będącymi w stałym obiegu pomiędzy systemami bio-, geo-, hydro- i atmosferycznymi. Obserwowane od lat rosnące zanieczyszczenie środowiska **metalami śladowymi** jest najczęściej wynikiem działań antropogenicznych, na przykład działania przemysłu hutniczego, górnictwa, rolnictwa czy utylizacji odpadów (Kabata-Pendias, 1993, Panagos i in. 2013). Zanieczyszczenie środowiska metalami jest szczególnie niebezpieczne, ze względu na ich trwały charakter (okres trwania ołowiu w klimacie umiarkowanym szacuje się na około 10 000 lat) oraz wzrastającą w ostatnich latach ich mobilność co skutkuje zwiększoną fitodostępnością. Pobrane i zakumulowane w roślinach pierwiastki wprowadzane są do łańcucha pokarmowego, tą drogą trafiając do wyższych poziomów łańcucha, gdzie mogą zagrozić zdrowiu i życiu zwierząt i ludzi (Aelion i in. 2008, Bhattacharya i in. 2012, Douay i in. 2013). Istnieją udokumentowane przypadki toksyczności różnych metali, według raportu wydanego przez amerykańską grupę ds. Działań na rzecz ochrony środowiska najbardziej zanieczyszczone miejsca na świecie zagrażają

zdrowiu ponad 10 milionów ludzi na całym świecie. Intensywność procesu pobierania, akumulacji i transportu jonów metali przez rośliny jest zależna od wielu czynników: gatunku rośliny, rodzaju gleby i jej parametrów, klimatu czy gospodarki wodnej (Sheoran i in. 2016). Większość pobranych jonów jest zatrzymywana w systemie korzeniowym przez wiązanie z elementami strukturalnymi ściany komórkowej jak związki pektynowe, ligniny i białka. Transport radialny i wertykalny w korzeniu odbywa się głównie poprzez przestrzeń ścian komórkowych i apoplast, w której dochodzi do kompleksowania metali z grupami funkcyjnymi. Istotną barierę stanowi endoderma, której komórki zawierają substancje hydrofobowe. Powoduje to ograniczenie transportu wody oraz rozpuszczonych w niej jonów metali i wymuszenie dalszego transportu poprzez symplast (Piechalak i in. 2002, Hanć i in. 2014). Część pobranych jonów jest transportowana do wnętrza komórki i pod ich wpływem uruchomione zostają mechanizmy, które mają za zadanie ich unieczynnianie oraz naprawę powstałych uszkodzeń.

Metale ze względów funkcjonalnych są często dzielone na dwie grupy, w zależności od zapotrzebowania organizmu: **niezbędne** (Cu, Zn, Ni, Fe, Mn, Co) oraz **niekonieczne** (Cd, Hg, As, Pb) (Nagajyoti i in. 2010; Vamerali i in. 2010). **Poziom fitotoksyczności** pierwiastków niekoniecznych zależy od ich koncentracji w środowisku, ale nawet pierwiastki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania w podwyższonym stężeniu są niebezpieczne (Nagajyoti i in. 2010, Bothe 2011). Pierwiastki z obu grup zagrażają homeostazie komórki, ponieważ z uwagi na niepełną podpowłokę atomową są wysoce reaktywne i posiadają zdolność do generowania reaktywnych form tlenu (Noctor i Foyer, 1998, Kutrowska i Szelag 2014). Obecność metali może prowadzić do **zaburzenia najważniejszych procesów metabolicznych** między innymi fotosyntezy i fotorespiracji, wzrostu elongacyjnego korzeni i pędów, ekspresji, translacji a także zaburzenia w gospodarce wodnej i związany z tym spadek suchej masy. Wykazano, że metale znacząco wpływają na agroeconomie inhibując rozwój i wzrost roślin, ograniczając ich kwitnienie i plonowanie (Weyens i in. 2009, Rascio i Navari-Izzo 2011).

Rośliny adaptując się do warunków środowiska wykształciły szereg mechanizmów tolerancji i odporności. **Mechanizmy odporności** to głównie wydajny system obniżania poziomu stresu przy jednoczesnym zachowaniu pobierania pierwiastków, podczas gdy **mechanizmy tolerancji** polegają głównie na ograniczeniu pobierania metali aby unikać obrażeń komórki (Baker, 1981). Procesy biorące udział w odpowiedzi na stres wywołany metalami można podzielić na dwie grupy: konstytutywne oraz indukowane. Mechanizmy konstytutywne są

wykorzystywane przez wszystkie rośliny, niezależnie od ich tolerancji na jony metali, do utrzymywania odpowiedniego poziomu metali przejściowych (Cu, Zn, Fe, Mg itd.), koniecznych do prawidłowego funkcjonowania. Zaliczamy do nich między innymi białka chaperonowe, transportery oraz **naturalne ligandy** metali biorące udział w homeostazie jak **kwasy organiczne** (cytrynowy, szczawiooctowy, jabłkowy), **aminokwasy**, **metalotioneiny** (Andrews, 2000, Callahan i in. 2006, Clemens, 2006). U roślin narażonych na działanie metali o wysokiej fitotoksyczności dochodzi do uruchomienia procesów indukowanych. Wykazano zwiększenie poziomu aktywności **enzymów metabolizmu siarki** oraz akumulację **proliny** oraz zmiany ekspresji wielu genów (Andrews, 2000, Slesak i in. 2007). Jednym z najważniejszych aktywowanych mechanizmów unieczynniania metali w komórce roślinnej jest **fitochelatynowy system detoksykacyjny**. W jego skład wchodzi **glutation GSH i jego homologi, cysteina, fitochelatyny PCs** oraz enzymy biosyntezy glutationu i fitochelatyn (Yadav, 2010, Noctor i in. 1998, 2012). Detoksykacja metali na terenie cytoplazmy przebiega poprzez ich wiązanie z ligandami jak glutation i fitochelatyny. **Glutation** jest tripeptydem obecnym we wszystkich komórkach eukariotycznych. Zbudowany jest z L-Glu, L-Cys i L-Gly, pomiędzy Glu a Cys występuje wiązanie  $\gamma$ -karboksylowe zapewniające GSH odporność na działanie większości peptydaz. Ze względu na powszechność występowania peptyd ten pełni szereg funkcji w komórkach roślinnych, między innymi jest antyoksydantem, bierze udział w transporcie aminokwasów i siarki, w indukcji apoptozy, regulacji potencjału oksydo-redukcyjnego, może bezpośrednio wiązać się z jonami metali oraz jest substratem w syntezie fitochelatyn. **Fitochelatyny** (PCs) są naturalnymi metalopeptydami roślinnymi, zbudowanymi z trzech aminokwasów: Glu, Cys, i Gly,. W strukturze fitochelatyn wyróżnia się powtarzający się człon ( $\gamma$ -Glu-Cys) $n$ -Gly, gdzie  $n$  wynosi od 2 do 11. PCs syntetyzowane są enzymatycznie przez dwupeptydylową transpeptydazę  $\gamma$ -glutamylcysteiny (EC 2.3.2.15) potocznie nazywaną syntazą fitochelatynową (PCS). Przypuszcza się, że syntaza fitochelatynowa jest regulowana posttranslacyjnie przez jony metali ciężkich, a do reakcji wymaga dwóch substratów: zredukowanego glutationu GSH i odpowiedniego tiolowanego metalu np. Cd-GS<sub>2</sub> lub Zn-GS<sub>2</sub>. Kompleksy pomiędzy fitochelatynami a jonami metalu tworzą się w cytozolu, są to tak zwane **kompleksy LMW** (ang. Low Molecular Weight). Kompleksy są aktywnie transportowane do wakuoli, gdzie są wiązane i przechowywane w postaci trwałych wysokocząsteczkowych kompleksów o wysokiej zawartości siarki. Proces ten pozwala na obniżenie stężenia metali na

terenie cytoplazmy oraz następuje ich częściowa eliminacja z ogólnego metabolizmu. Badania ultrastrukturalne potwierdziły obecność złogów metali w wakuoli ale również wykazały ich obecność w innych kompartmentach komórki jak ściana komórkowa, retikulum endoplazmatycznym, przestrzeni okołojądrowej, diktiosomy, aparat Golgiego i plasmodesmy (Małecka i in. 2008, 2009).

Lepsze poznanie mechanizmów wszystkich elementów związanych z przystosowaniem roślin do warunków stresowych, pobieraniem metali, translokacją oraz mechanizmami ich detoksykacji jest niezwykle ważnym etapem na drodze do efektywnego zastosowania roślin w remediacji skażonego metalami śladowymi środowiska.

#### Cele badawcze i ogólne uwagi metodyczne

W doświadczeniach, których rezultatem są publikacje prezentowane jako moje główne osiągnięcie naukowe, nadrzędnym celem było zbadanie zależności wpływające na zdolność roślin do akumulacji i translokacji wybranych metali śladowych oraz indukcja fitochelatynowego systemu detoksykacyjnego u wybranych roślin motylkowych.

W literaturze, którą prześledziłam rozpoczynając planowanie kierunku badań, nie było jednoznacznych informacji dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za transport metali, szczególnie ołowiu, w tkankach roślin a także do ich części nadziemnych. Ponadto nie było również potwierdzonych doniesień dotyczących tworzenia u tych roślin kompleksów metal-fitochelatyny czy metal-glutation. Publikowane dane były często rozbieżne, badania prowadzone techniką HPLC/ICP-MS przez Leopolda i inni (1999) wykazały, że kompleksy z fitochelatynami tworzą jedynie jony Cd i Cu, natomiast zastosowanie technik spektroskopii UV i dichroizmu kołowego sugerowało, że również Pb może tworzyć kompleksy z PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> oraz PC<sub>4</sub> (Mehra 1995).

Jako główny cel badawczy postawiłam analizę zdolności pobierania, akumulacji i transportu metali śladowych ze szczególnym uwzględnieniem ołowiu i kadmu, intensywności biosyntezy glutationu lub jego homologów i fitochelatyn głównie w roślinach grochu w zależności od czasu i intensywności stresu, identyfikację fitochelatyn oraz kompleksów metal-fitochelatyny w odpowiedzi na różne metale śladowe.

Głównym obiektem badań była popularna w Polsce roślina uprawną - groch (*Pisum sativum*), która w literaturze była wskazywana jako roślina o możliwym zastosowaniu w fitoremediacji. Rośliny te charakteryzują się dobrą tolerancją na obecność metali śladowych,



szybkim przyrostem biomasy i zróżnicowaną zdolnością do biosyntezy glutationu i fitochelatyn oraz akumulacji metali. Rośliny uprawiane były hydroponicznie w kontrolowanych warunkach (Piechalak i inni, 2002) z dodatkiem ołowiu ale również innych metali śladowych o różnych właściwościach utleniających: Cd, Cu, Zn pojedynczo lub w dwuskładnikowych kombinacjach.

W doświadczeniach wykorzystałam zaawansowane techniki sprzężone: SEC/ICP-MS (size exclusion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry), HPLC/ESI-MS<sup>n</sup> (high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection), ICP-MS (inductively coupled plasma and mass spectrometry), LA ICP MS (Laser ablation with inductively coupled plasma and mass spectrometry) oraz techniki standardowe: HPLC (high-performance liquid chromatography) z derywatyzacją za kolumną z odczynnikiem Ellamana oraz metody spektroskopowe. Dobór technik i narzędzi pozwolił na oznaczanie form specyjalnych pierwiastków w materiale roślinnym, zidentyfikowanie białek chelatujących metale w roślinach, śledzenie transportu pierwiastków w poszczególnych organach (korzeniach, łodygach i liściach) i analizowanie ich interakcji.

#### Dyskusja osiągniętych wyników i ich wykorzystanie w pracy badawczej

Znaczenie, składniki i funkcje roślinnych mechanizmów unikania i tolerancji ze szczególnym uwzględnieniem systemu detoksykacyjnego opisałam w pracy **A2**. Do mechanizmów odporności na metale ciężkie należą:

- wydzielanie śluzów i ligandów chelatujących metale oraz zmianę właściwości plazmolemy co ogranicza przenikanie metali do symplastu;
- wiązanie jonów metali przez składniki ściany komórkowej, zapobiegające dalszemu transportowi w apoplacie komórki;
- detoksykacja poprzez wytwarzanie kompleksów metali z kwasami nieorganicznymi i organicznymi (jabłkowym, cytrynowym, szczawiooctowym), pochodnymi fenoli, glikozydami oraz aminokwasami
- chelatowanie metali przez glutation i fitochelatyny oraz ich homologi, przemieszczenie kompleksów metal-fitochelatyna do wakuoli;

Prowadzone przeze mnie badania eksperymentalne koncentrowały się na określeniu czynników warunkujących zdolności roślin do pobierania, akumulacji i transportu metali oraz cytoplazmatycznym systemie glutationowo-fitochelatynowym detoksykacji metali przez rośliny motylkowate. Wiedza ta jest niezbędna dla na określenia czy badane rośliny mogą znaleźć

zastosowanie aplikacyjne w technikach wykorzystywanych do remediacji środowiska i przyczynia się do lepszego zrozumienia kompleksowej odpowiedzi na stres wywołany metalami.

Technologie fitoremediacyjne skupiają się na zastosowaniu roślin do procesów usuwania, przenoszenia, stabilizacji i degradacji zanieczyszczeń w glebie, powietrzu lub wodzie. **Fitoremediacja** znalazła zastosowanie między innymi w oczyszczaniu zdegradowanych terenów przemysłowych z zanieczyszczeń organicznych i metali. Największe sukcesy przy oczyszczaniu tych terenów odnosi dział fitoremediacji zwany **fitoekstrakcją**. Metoda ta wykorzystuje naturalne lub wspomagane zdolności roślin do pobierania i akumulacji pierwiastków śladowych (Jadia i Fulekar 2009). Rośliny za pomocą systemu korzeniowego pobierają metale z gleby i przemieszczają do części nadziemnych, które są następnie zbierane. Metoda ta wykorzystuje przede wszystkim rośliny jednoroczne, tolerancyjne na zanieczyszczenia, których coroczna uprawa pozwala na uzyskanie dużej biomasy a tym samym wysokiego „plonu zanieczyszczeń”. Ze względu na ograniczenia technika ta, aby mogła być efektywnie i ekonomicznie opłacalnie wykorzystywana, wymaga zabiegów podwyższających akumulację i translokację metali do części nadziemnych oraz przyrost biomasy (Quartacci i in. 2006). Jednym z rozwiązań jest podanie zewnętrzne w czasie uprawy syntetycznych lub naturalnych związków kompleksujących czyli **chelatorów** w procesie **fitoekstrakcji indukowanej**. Idea tej metody polega na zastosowaniu chelatorów, które wykazują silne powinowactwo do kationów metali i w postaci kompleksów są łatwo pobierane przez rośliny. W związku z tym można założyć, że rolą w takim układzie chelatora jest zwiększenie jednocześnie pochłaniania i translokacji metali, a także zmniejszenie toksyczności wolnych kationów metali w organach fotosyntetycznych poprzez ich kompleksowanie (Hernandez-Allica i in., 2003 Tandy i in. 2006). W moich badaniach wykorzystałam **EDTA** (kwas etylenodiaminotetraoctowy), który wskazywany był w literaturze jako niezwykle skuteczny ligand ołowiu. EDTA podwyższa pobieranie i translokację metali, siła tego efektu zależy od stabilności kompleksu EDTA-metal, a także pH środowiska i naturalnej biodostępności metalu (Chen i in. 2004, Bhargava i in. 2012). Obserwowany względny efekt mobilizacji może być bardzo wysoki, szczególnie jeśli naturalna mobilność metalu jest bardzo niska, tak jak ma to miejsce w przypadku Pb (Saifullah i in. 2009). We wcześniejszych badaniach wykazałam że wśród badanych roślin motylkowych fasola *Phaseolus vulgaris* i groch *Pisum sativum* wykazywały potencjał do akumulacji ołowiu, aczkolwiek ponad 90% metalu zostało zatrzymanych w korzeniach (Piechalak i in. 2002). W celu

podwyższenia udziału części nadziemnych w akumulacji badałam wpływ obecności chelatora na mobilność i toksyczność jonów ołowiu. W pracy **A1** wykazałam **indukcję zarówno pobierania jak i transportu ołowiu do części nadziemnych stosując suplementację EDTA**. W tkankach badanych roślin została zakumulowana prawie o 70% większa ilość ołowiu, zaś do łodyg i liści przetransportowano dwa razy większa ilość metalu, które stanowiło 16% całego pobranego ołowiu, w stosunku do roślin hodowanych tylko z Pb. Huang i in. 1997 wykazał znacznie, bo nawet 100 krotnie, wyższą translokację ołowiu z EDTA do części nadziemnych grochu, podobne wzmocnienie pobierania udokumentowano również dla innych roślin (Grcman i in. 2001, Wu i in. 2004). Aczkolwiek analizując uzyskany w **A1** efekt należy wziąć pod uwagę krótki okres trwania ekspozycji, specyficzność gatunkową oraz wczesny etap rozwoju roślin. Zupełnie inne rezultaty otrzymałam dla roślin fasoli, w pracy **A5** wykazałam **inhibujący wpływ obecności EDTA w środowisku na całkowity poziom akumulacji ołowiu**. Ograniczenie to sięgało od 30 do aż 90% całkowitej zawartości metalu w zależności od jego stężenia, doniesienia o podobnym efekcie zastosowania EDTA są niezwykle rzadkie (Jiang i in. 2003). Mechanizm odpowiadający za podobną reakcję jest nieznan, najprawdopodobniej główna rolę w wiązaniu ołowiu odgrywają u tych roślin składniki wchodzące w skład ścian komórkowych powierzchniowych części korzeni, szczególnie polisacharydy takie jak celulozy, ligniny i pektyny (Basińska i in. 2014, Krzesłowska i in. 2016). W warunkach gdy dostępny metal występuje w postaci skompleksowanej nie może zostać związany ze składnikami strukturalnymi ścian co drastycznie zmniejsza zdolność roślin do jego akumulacji. **Zastosowanie EDTA zmniejszyło całkowitą akumulację ołowiu ale znacznie, 3 - 6 krotnie, podwyższyło translokację Pb do łodyg i liści** w stosunku do roślin hodowanych tylko z Pb. Dla obu roślin zaobserwowałam opisane w **A1** i **A5** **obniżenie fitotoksyczności skompleksowanego metalu**, widoczne w podwyższeniu przyrostu biomasy oraz wartości współczynnika IT (Indeks Tolerancji) określającego rozwój systemu korzeniowego.

W pracy **A7** z zastosowaniem techniki ablacji laserowej (LA ICP MS) potwierdziłam, że **większość pobranego ołowiu rośliny akumulują w warstwach powierzchniowych powierzchni korzeni ze składnikami ścian komórkowych zaś miedź i cynk jako pierwiastki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania, były znacznie łatwiej translokowane do części nadziemnych**. Wykazałam, że w korzeniach grochu Cu gromadzona była głównie w częściach zewnętrznych - exodermie i epidermie - niż w wewnętrznych warstwach - parenchymie, endodermie i tkankach przewodzących, aczkolwiek nadal na relatywnie wysokim poziomie

intensywności sygnału. Cu i Zn były również były łatwo transportowane do części nadziemnych. Taki rozkład potwierdza wiązanie jonów, szczególnie ołowiu, ze składnikami ściany komórkowej i tylko częściowy transport w kierunku endodermy. **Stosunkowo wysoki poziom sygnału Pb w warstwie endodermalnej, potwierdził jej zaporową funkcję w transporcie dalekim ołowiu i konieczność poszukiwania dodatkowych rozwiązań aby można było efektywnie wykorzystać rośliny w remediacji terenów zanieczyszczonych ołowiem.** Analiza jonów kadmu pokazała ich równomiernie rozmieszczone we wszystkich analizowanych tkankach, co potwierdza ich wysoką mobilność. Toksyczne jony metali przedostają się do tkanek roślinnych wraz z substancjami odżywczymi z roztworu glebowego (Dal Corso i in. 2013, Hossain i Komatsu 2013). Najczęstszym fizjologicznym wynikiem ekspozycji na metale ciężkie jest zmniejszenie wzrostu elongacyjnego i obniżenie przyrostu biomasy co udokumentowałam w pozycjach **A1** i **A5**. Rośliny wymagają mineralnych składników odżywczych do wzrostu i każdy z nich ma witalną funkcję w roślinach i jest wymagany w różnych ilościach do prawidłowego rozwoju. W pracy **A7** wykazałam **zmiany w poziomie makroelementów: fosforu, potasu, wapnia, magnezu i miedzi** w korzeniach grochu w warunkach stresu metalami śladowymi. Obecność ołowiu i kadmu w środowisku powodowało wzrost poziomu  $Mg^{2+}$ , w roślinach eksponowanych obserwowałam około 2 do 2,5 krotnie wyższy poziom tego pierwiastka niż w roślinach kontrolnych. Wykazałam również zaburzenia, najczęściej objawiające się obniżeniem poziomu wapnia, potasu i fosforu oraz miedzi. Obata i Umebayashi (1997) sugerowali, że zaburzenie równowagi mineralnej może to być wynikiem zmiany przepuszczalności błony komórkowej czego efektem jest zahamowanie wchłaniania wody i makroelementów. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że magnez uczestniczy w procesach tolerancji. Drazic i in. (2004) również wykazali dwukrotny wzrost magnezu w korzeniach soi uprawianej w obecności Cd. Zaburzenia wapnia prawdopodobnie są spowodowane przez konkurencję pomiędzy  $Ca^{2+}$  a  $Cu^{2+}$  i  $Pb^{2+}$  o transport przez kanały wapniowe. Obserwowany spadek wapnia w roślinach traktowanych metalami może być szczególnie niebezpieczny. Stwierdzono, że przy niskim stężeniu wapnia ta sama ilość ołowiu w tkankach jest bardziej toksyczna niż przy wyższym poziomie wapnia (Antosiewicz 2005). Przedstawione wyniki pokazują, że metale śladowe jak miedź, kadm lub ołów, mogą zakłócać pobieranie i dystrybucję niezbędnych pierwiastków. Prawdopodobnie fitotoksyczność tych metali była częściowo spowodowana zaburzeniami w poziomie

makroelementów a poprzez nie licznych procesów metabolicznych decydujących o prawidłowym funkcjonowaniu rośliny.

We wcześniejszych badaniach (Piechalak i in. 2002) wykazałam, że niewielka, kilku procentowa, część jonów była transportowana do części nadziemnych a zaledwie ułamek procenta przedostawał się do komórek w postaci wolnych jonów, z czego większość jest wiązana przez niskocząsteczkowe ligandy lub peptydy. Mechanizm ten opisałam w pracy **A2**, kompleksy pomiędzy fitochelatynami a metalem tworzą się w cytozolu, są to tak zwane kompleksy LMW (ang. Low Molecular Weight), które następnie są transportowane do wakuoli. U roślin owsa zidentyfikowano ATP-zależne białko transportowe wykazujące homologię do transportera w tonoplaście drożdży, zdolne do przenoszenia zarówno apofitochelatyn jak i kompleksów LMW. Ponadto zarówno u drożdży jak i w komórkach owsa wykazano obecność w tonoplaście antyportera  $H^+/Cd^{2+}$ , którego aktywność zależy od gradientu protonów. W wakuoli pod wpływem niskiego pH kompleksy LMW ulegają rozpadowi, a uwolniony metal jest wiązany i gromadzony w postaci kompleksów z kwasami organicznymi oraz wysokocząsteczkowych kompleksów HMW o dużej zawartości siarki. Część peptydowa kompleksów LMW może zostać zdegradowana przez wakuolarnie hydrolazy na fragmenty lub wolne aminokwasy. Stwierdzono, że kompleksy HMW występują na terenie wakuoli jako agregaty o średnicy 20 Å, których „jądro” stanowi krystaliczny CdS otoczony dookoła fitochelatynami. Dzięki większej zawartości siarki chelatowanie metalu w HMW jest efektywniejsze a kompleks wykazuje wyższą stabilność (Cobbet i in. 1998, Cobbet 2000). Nie było jednak jednoznacznie wykazane, które spośród metali zarówno indukują biosyntezę fitochelatyn jak i tworzą kompleksy z PCs, oraz czy wiązanie jonów to jedyna funkcja PCs w roślinach. Wysoka zawartość reszt cysteinowych w peptydach sugerowała wysoki potencjał wiązania jonów metali dwuwartościowych ale mogła również wskazywać na udział w obronie przed reaktywnymi formami tlenu. Zastosowanie bardziej czułej techniki HPLC ESI MS pozwoliło mi na analizę i identyfikację glutationu i fitochelatyn nie tylko w korzeniach ale również w łodygach i liściach roślin grochu i łubinu hodowanych w obecności ołowiu i kadmu. W pracy **A1** oraz **A3** wykazałam, że w **pierwszych godzinach stresu następowała biosynteza fitochelatyn niskocząsteczkowych a dopiero po kilkunastu godzinach pojawiały się homofitochelatyny oraz fitochelatyny długołańcuchowe**. Ponadto jak wykazałam w **A4 poziom PCs był zależny od organu roślin i rodzaju metalu**. Najwyższy poziom biosyntezy fitochelatyn obserwowałam w korzeniach obu roślin w odpowiedzi na stres

wywołany jonami kadmu, w ekstrakcie korzeni obecne były głównie zredukowane formy PCs które mogą wiązać się z jonami metali. W łodygach i liściach badanych roślin poziom fitochelatyn był wielokrotnie niższy i przeważała forma utleniona fitochelatyn. Związane jest to z ograniczonym transportem metali a szczególnie jonów ołowiu do części nadziemnych. Potwierdzało to moją teorię, że **fitochelatyny oprócz roli naturalnego liganda metali, szczególnie w środowisku o niskiej zawartości wolnych jonów kadmu i ołowiu mogą uczestniczyć w odpowiedzi antyoksydacyjnej**. W badanych roślinach wykazałam również zmiany zawartości zredukowanej formy glutationu GSH, szczególnie w pierwszych godzinach działania stresu co związane jest z wykorzystaniem tego peptydu jako substratu w biosyntezie fitochelatyn. Następnie, poziom glutationu wzrastał, mimo wzrostu ilości powstających z nich fitochelatyn co świadczyło o aktywacji enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę GSH. W korzeniach grochu i łubinu stwierdziłam również bardzo wysoki poziom disulfidu glutationu GSSG, co wskazywało na **zaburzenie stanu redox** spowodowane nadmiernym generowaniem reaktywnych form tlenu.

W dalszych badaniach postanowiłam potwierdzić powstawanie kompleksów metal-fitochelatyne dla jonów kadmu i ołowiu. Wyniki zostały zaprezentowane w pracy **A6**. Wykazałam za pomocą techniki SEC-ICP-MS powstawanie **kompleksów kadm-ligand o masie cząsteczkowej powyżej 12 kDa**, chelaty te obserwowałam zarówno w ekstraktach z roślin hodowanych w obecności Cd jak i Cd+Pb. Zastosowanie HPLC ESI MS pozwoliło na **identyfikację liganda jako fitochelatyny**. W eksperymencie z jonami ołowiu obserwowałam powstawanie kompleksów z Pb o masie cząsteczkowej 66 kDa - chelat ten był obecny w ekstraktach z roślin uprawianych z Pb jak i w niewielkiej ilości próbce z Cd+Pb. **Nie wykazałam obecności form ołów-fitochelatyne w badanych roślinach**. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazałam, że **obecność fitochelatyn w roślinach uprawianych w obecności kadmu jest ściśle związana z ich funkcją naturalnego liganda metali**. Natomiast u roślin eksponowanych na ołów, tworzyły się kompleksy o masie ponad 60 kDa z niezidentyfikowaną cząsteczką. Syntetyzowane fitochelatyny najprawdopodobniej biorą udział w homeostazie metali koniecznych podobnie jak metalotioneiny oraz pełnią funkcję antyoksydanta o czym świadczy obecność form utlenionych PCs. Potwierdzałoby to również wcześniej postawioną hipotezę o **możliwości działania PCs jako "zmiatacza" RFT**. Znaczne różnice [sześć razy wyższe w ekstrakcie roślin eksponowanych na Pb niż do Cd / Pb] w intensywności

kompleksowania ołowiu pomiędzy roślinami traktowanymi tylko ołowiem a kombinacją ołów/kadm wynikają z interakcji metali. We wcześniejszych badaniach wykazałam (Kózka i in. 2006), że w roślinach grochu obecność kadm znacząco ograniczała pobieranie ołowiu. Pokazuje to znaczenie identyfikacji interakcji pomiędzy metalami dla pełnego zrozumienia mechanizmów detoksykacji.

#### Podsumowanie i dalsze perspektywy badawcze

W publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego udowodniłam zaangażowanie glutationu i fitochelatyn nie tylko w proces detoksykacji jonów metali ale również w odpowiedź na stres oksydacyjny towarzyszący obecności metali. Wykazałam również konieczność kompleksowych badań mechanizmów pobierania i transportu metali ze względu na obecne zależności i powiązania pomiędzy rozwojem, plonowaniem, tolerancją a możliwością wykorzystania aplikacyjnego roślin w procesie fitoremediacji. W mojej ocenie **najważniejszymi wynikami przeprowadzonych badań jest** identyfikacja roli fitochelatyn jako naturalnego antyoksydanta u roślin, wyznaczenie obecności wysokocząsteczkowych kompleksów ołów-proteina w ekstrakcie z traktowanych korzeni, potwierdzenie drogi krótkodystansowego transportu metali śladowych oraz wskazanie na istnienie zależności pomiędzy poziomem akumulacji, translokacją metali a zastosowanym chelatorem, które należy brać pod uwagę przy planowaniu praktycznego stosowania roślin w fitoekstrakcji wspomaganiej.

W przyszłości planuję badania, które pozwolą na zidentyfikowanie białka wchodzącego w skład kompleksu ołów-ligand, wskazanie elementów odpowiedzialnych za transport metali, szczególnie ołowiu, do części nadziemnych oraz kontynuowanie badań związanych z zastosowaniem różnych czynników wspomagających fitoekstrakcje jak kwas nitrylotriooctowy (NTA), ramnolipidy oraz bakterie probiotyczne. Poznanie działania mechanizmu odpowiedzialnego za zdolność do pobierania, akumulowania, translokowania i sequestrowania metali w tkankach i komórkach roślinnych poszerzy nasze rozumienie funkcjonowania roślin w warunkach stresu i przyczyni się do planowania ich bardziej efektywnego wykorzystania w fitoremediacji.

#### Finansowanie prac doświadczalnych związanych z realizacją osiągnięcia naukowego

Powstałe publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego zawierają wyniki badań, których realizacja objęta była finansowaniem z grantu badawczego Komitetu Badań

Naukowych nr 1T09D 057 30 (A4, A5, A6), nr NN 305 38 11 38 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (A7), a także innymi projektami badawczymi.

## 5. Literatura

- Aelion, C. M., Davis, H. T., McDermott, S., Lawson, A. B. Metal concentrations in rural topsoil in South Carolina: potential for human health impact. *Science of the Total Environment*, 2008, 402(2), 149-156.,
- Andrews, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical pharmacology*, 2000, 59(1), 95-104.
- Antosiewicz D. M. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environmental Pollution*, 2005, 134(1): 23-34.
- Baker, A. J. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition*, 1981, 3(1-4): 643-654.
- Basinska A., Rabeda I., Suski S., Bilski H., Mellerowicz E. J., Napieralska A., ... & Krzeslowska M. The plant cell wall in response to trace metals. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. Supplement*, 2014, 56(2): 53-
- Bhargava A., Carmona F.F., Bhargava M., Srivastava S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management* 2012, 105: 103-120.
- Bhattacharyya P. N., Jha D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327-1350.,
- Bothe H. 2011. Plants in heavy metal soils. In *Detoxification of heavy metals* (pp. 35-57). Springer Berlin Heidelberg.
- Callahan D. L., Baker A. J., Kolev S. D., Wedd A. G. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2006, 11(1): 2-12.
- Chen Y., Li X., Shen Z. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere* 2004, 57(3): 187-196.
- Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1707-1719.
- Cobbett C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology* 2000, 123(3): 825-832.
- Cobbett C. S., May M. J., Howden R., & Rolls B. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *The Plant Journal*, 1998, 16(1): 73-78.
- DalCorso G., Manara A., Furini, A. An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics*, 2013, 5(9): 1117-1132.
- Douay, F., Pelfrène, A., Planque, J., Fourrier, H., Richard, A., Roussel, H., Girondelot, B. Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185(5): 3665-3680.



Dražić, G., Mihailović, N., & Stojanović, Z. Cadmium toxicity: the effect on macro-and micro-nutrient contents in soybean seedlings. *Biologia Plantarum*, 2004, 48(4): 605-607.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 2006, 9(4): 436-442.

Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. F., Dommes, J. 2002 Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 2002, 37(3): 263-285.

Grčan H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B., Leštan D. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil* 2001, 235: 105–114

Hanč A., Piechalak A., Tomaszewska B., & Barańkiewicz D. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in quantitative analysis and imaging of plant's thin sections. *International Journal of Mass Spectrometry* 2014, 363: 16-22.

Hernández-Allicia J, Garbisu C, Becerril JM, Barrutia O, García-Plazaola JI, Zhao FJ, McGrath SP. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ* 2006, 29:1422–1429

Hossain Z., Komatsu S. Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in plant science* 2013, 3: 310.

Huang J W, Chen J, Berti W R and Cunningham S D Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 3: 800–805.

Jadia C., Fulekar M. Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. *African Journal of Biotechnology* 2009, 8: 921-928.

Jiang X. J., Luo Y. M., Zhao Q. G., Baker A. J. M., Christie P., & Wong, M. H. Soil Cd availability to Indian mustard and environmental risk following EDTA addition to Cd-contaminated soil. *Chemosphere* 2003, 50(6), 813-818.

Kabata-Pendias A. Behavioural properties of trace metals in soils. *Applied Geochemistry* 1993, 8: 3-9.

Kózka M., Barańkiewicz D., Piechalak A., Tomaszewska B. Determination of thiol compounds in *Pisum sativum* exposed to lead and cadmium ions by HPLC with post-column derivatization. *Chemical Analysis*, 2006, 51(3):427-437

Krzesłowska M., Rabęda I., Basińska A., Lewandowski M., Mellerowicz E. J., Napieralska A., Woźny A. Pectinous cell wall thickenings formation—A common defense strategy of plants to cope with Pb. *Environmental Pollution*, 2016, 214: 354-361.

Kutrowska A, Szelać M. 2014. Low-molecular weight organic acids and peptides involved in the long-distance transport of trace metals. *Acta Physiologiae Plantarum* 2014: 1-12.

Leopold, I., Günther, D., Schmidt, J., Neumann, D. 1999. Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 1999, 50(8): 1323-1328.

- Malecka A, Piechalak A, Tomaszewska B. Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. *Acta Physiologiae Plantarum* 2009, 31: 1053-63.
- Małeczka, A., Piechalak, A., Morkunas, I., Tomaszewska, B. Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2008, 30(5): 629-637
- Mehra R. K., Mulchandani P. Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins. *Biochemical journal* 1995, 307(3): 697-705.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han YI, Neukermans J, Marquez-Garcia Belen. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environment* 2012, 35: 454-84.
- Noctor, G., Foyer, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 1998, 49(1): 249-279.
- Obata, H., Umebayashi, M. Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, 1997, 20(1): 97-105.
- Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., Montanarella, L. Contaminated sites in Europe: review of the current situation based on data collected through a European network. *Journal of Environmental and Public Health*, 2013. Article ID 158764, 11 pages
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry*, 2002, 60(2): 153-162.
- Quartacci MF, Argilla A, Baker AJM, Navari-Izzo F. Phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by Indian mustard. *Chemosphere* 2006, 63: 918-25.
- Rascio N., Navari-Izzo F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 2011, 180: 169-181.
- Saifullah Meers E., Qadir M., de Caritat P., Tack F.M.G., Du Laing G., Zia M.H. EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere* 2009, 74: 1279-1291.
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., Poonia, P. Factors affecting phytoextraction: A review. *Pedosphere*, 2016, 26(2): 148-166.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, 54(1): 39.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 2014, 203(1): 32-43.
- Tandy S., Schulin R., Nowack B. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere*, 2006, 62(9): 1454-1463.
- Vamerali T., Bandiera M., Mosca G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters* 2010, 8:1-17.
- Weyens N., van der Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J.. Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(2): 248-254.

Wu L. H., Luo Y. M., Xing X. R., Christie P. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 2004, 102(3): 307-318.

Yadav S. K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 2010, 76(2): 167-179.

## 6. Omówienie pozostałego dorobku

Jestem autorem/współautorem **27** artykułów i monografii naukowych (z wyłączeniem streszczeń konferencyjnych), z których **17** znajduje się na liście *Journal Citation Reports*. Łączna liczba punktów MNiSW wynosi **462<sup>2</sup>**, a sumaryczny *Impact factor* **31,058<sup>1</sup>**. Moje prace były do tej pory cytowane **374<sup>3</sup>** razy, z czego **338 bez autocytowań**, Indeks Hirscha wynosi **9<sup>3</sup>**. Za osiągnięcia w pracy naukowej zostałam wyróżniona nagrodą zespołową III stopnia przez Rektora Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu w 2003, 2009 i 2010 roku.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłam w realizacji **7** projektów badawczych. Wyniki swoich badań prezentowałam na konferencjach zarówno krajowych, jak i zagranicznych. Badania prowadzę przy współpracy z naukowcami z Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, Uniwersytetu Przyrodniczego im Cieszkowskiego w Poznaniu, Politechniki Poznańskiej oraz Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Szczegółowy wykaz wszystkich moich prac naukowych, informacje o referatach i posterach prezentowanych na konferencjach tematycznych oraz o udziale w realizacji projektów badawczych zostały przedstawione w Załączniku 4. Poniżej przedstawiłam swoje osiągnięcia w ramach poszczególnych kierunków badawczych oraz zestawienie wskaźników bibliometrycznych ze strony Web of Science.

1. Impact factor (IF) zgodny z rokiem opublikowania.
2. Punktacja zgodnie z Wykazem czasopism naukowych aktualnym dla roku opublikowania artykułów
3. Według *Web of Science*

### Interakcje pomiędzy metalami

Większość dostępnych badań skupia się na wpływie pojedynczych pierwiastków śladowych na rośliny, podczas gdy rośliny są narażone równoczesny wpływ różnych jonów metali w glebie. Metale wchodzą ze sobą w interakcje podczas pobierania metalu do korzeni i transportu metalu do pędów i kompleksowo wpływają na funkcjonowanie mechanizmów detoksykacji. W dotychczasowych badaniach obserwowaliśmy bardzo silną konkurencję pomiędzy kadmem i ołowiem, obecność kadmu powodowała wielokrotne obniżenie pobierania i translokacji ołowiu w roślinach grochu. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy **Kózka i in. 2006**. W artykule **Kutrowska i in. 2017** opisane zostały nasze badania prowadzone na gorczycy sarepskiej *Brassica juncea* odm Malopolska - wykazującej cechy hiperakumulatora. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką tolerancję roślin gorczycy na stres wywołany metalami śladowymi i sugerują, że może zostać ona wykorzystana do fitoekstrakcji Cd i Pb. Analizując trendy w pobieraniu i transporcie metali w badanych kombinacjach obserwowałam bardzo silną zależność synergistyczną pomiędzy Zn a Pb zarówno na poziomie pobierania jak i co niezwykle istotne w transporcie obu metali do części nadziemnych. Obecność tej interakcji u roślin gorczycy sarepskiej może mieć wpływ na jej wydajność w procesie fitoekstrakcji i zastosowanie aplikacyjne.

### .Bioremediacja związków ropopochodnych z zastosowaniem roślin i bakterii probiotycznych

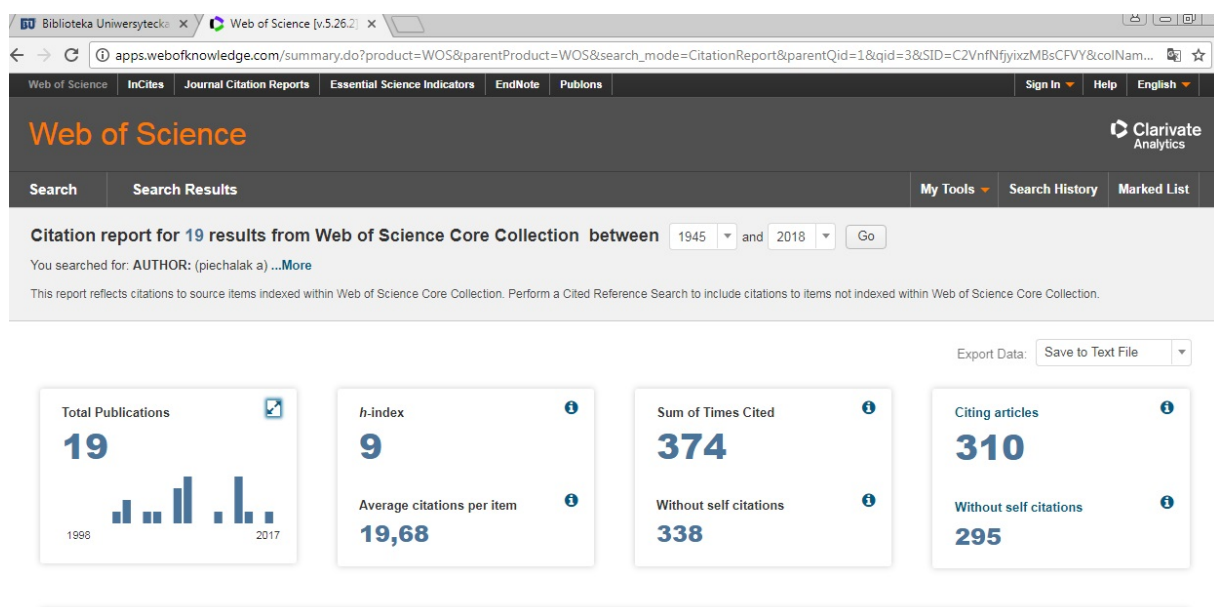
Tereny skażone substancjami ropopochodnymi, która staje się odpadem zaliczanym do kategorii tzw. odpadów niebezpiecznych, czyli takich, które są szczególnie szkodliwe dla życia biologicznego i prawidłowego funkcjonowania ekosystemu, stanowi dość duży problem. Włączyłam się w poszukiwania efektywnych metod remediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym. Jako obiekt badań wybrałam rośliny rzepaku i kukurydzy, konsorcja bakterii rozkładających związki ropopochodne oraz bakterie probiotyczne. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pozycji Wojtera Kwiczor J., Żukowska W., Graj W., Małecka A., **Piechalak A.**, Ciszewska L., Chrzanowski Ł., Lisiecki P., Komorowicz I., Barańkiewicz D., Voss I., Scheibe R., Tomaszewska B. Rhizoremediation of diesel-contaminated soil with two rapeseed varieties and petroleum degraders reveals different responses of the plant defence mechanisms. *International Journal of Phytoremediation* 2014; 16: 770-789 oraz były prezentowane na konferencjach naukowych, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych.

### Nowa generacja herbicydów - ciecze jonowe

Ciecze jonowe (IL), często nazywane zielonymi rozpuszczalnikami, są solami w stanie ciekłym. Ze względu na swoje unikalne właściwości sole jonowe mają wiele potencjalnych zastosowań, między innymi w 2011 roku w literaturze wprowadzono pojęcie herbicydowych cieczy jonowych. Testy toksyczności dla nowo zsyntetyzowanych cieczy jonowych przeprowadza się na standardowych szczepach bakteryjnych, co skutkuje nierealistycznymi wartościami EC50 dla każdej substancji. Dlatego niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowych badań toksyczności soli jonowych dla bardziej naturalnych konsorcjach bakteryjnych lub na roślinach, które w niedalekiej przyszłości mogą być narażone na toksyczne wycieki, ze względu na zwiększone stosowanie IL-ów.

We współpracy z naukowcami z Politechniki Poznańskiej badałam wpływ pięciu cieczy jonowych na rozwój i stan ekofizjologiczny siewek grochu siewnego (*Pisum sativum*). Testowałam poziom kiełkowania, wskaźnik tolerancji (dla długości korzeni, łodyg, świeżej i suchej masy), względnej zawartości wody RWC, zawartości chlorofilu a i b, generowania reaktywnych form tlenu i aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Wyniki tych badań były prezentowane jako doniesienia na konferencjach naukowych, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych.

### ***Dane bibliometryczne***



## 7. Omówienie osiągnięć dydaktycznych, popularyzatorskich i organizacyjnych.

Zarówno w trakcie studiów doktoranckich, jak i w okresie po uzyskaniu stopnia doktora, aktywnie angażowałam się w działalność dydaktyczną, popularyzatorską oraz organizacyjną na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W ramach działalności dydaktycznej prowadziłam zajęcia w formie ćwiczeń laboratoryjnych, konwersatoriów, seminariów oraz wykładów z zakresu biochemii i biotechnologii dla studentów kierunków biologia, biotechnologia oraz ochrona środowiska. Zajęcia prowadziłam głównie dla studentów studiów stacjonarnych, ale również dla słuchaczy studiów podyplomowych i studiów niestacjonarnych. Jestem koordynatorem przedmiotów "Biotechnologia w ochronie środowiska" i "Przemysł a środowisko - cykl życia produktu" - dla których opracowałam wykłady oraz protokoły wykonania ćwiczeń i które cieszą się dużym zainteresowaniem. W roku 2016 uczestniczyłam w kursie Szkoły Tutorów i obecnie prowadzę zajęcia tutoringowe dla 3 studentów I roku w ramach programu KRAB. W okresie od uzyskania stopnia doktora, byłam promotorem 10 prac licencjackich i 1 pracy magisterskiej oraz opiekunem naukowym 6 prac magisterskich. Za osiągnięcia w pracy dydaktycznej zostałam wyróżniona nagrodą II stopnia przez Rektora Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu w roku 2011,

W ramach działalności popularyzatorskiej organizowałam wykłady otwarte „*Powtórka przed maturą*” oraz dwukrotnie konkurs „*Biologiczna Ekstra-Klasa*” dla uczniów szkół średnich. Ponadto, współorganizowałam zajęcia i wystawy prezentowane w ramach Nocy Naukowców, Nocy Biologów, Dnia Fascynacji Roślinami oraz Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki z zakresu biochemii, biotechnologii i biologii molekularnej. W 2014 roku organizowałam i koordynowałam I Dni Akademickie, zajęcia dedykowane dla klas patronackich Wydziału Biologii UAM w Poznaniu, w kolejnych edycjach Dni Akademickich prowadziłam zajęcia laboratoryjne z zakresu biologii molekularnej. W ramach działalności popularnonaukowej organizowałam również w 2014 roku prezentację działalności naukowej Wydziału Biologii na ogólnopolskiej imprezie - Pikniku Naukowym w Warszawie.

W ramach działalności organizacyjnej aktywnie uczestniczyłam w organizacji 11 seminariów i konferencji krajowych i międzynarodowych. Z ramienia Dziekana Wydziału Biologii w latach 2008-2012 uczestniczyłam w Targach Edukacyjnych i Salonie Maturzystów prezentując ofertę dydaktyczną oraz naukową. W 2015 organizowałam wystawę fotograficzną prezentującą badania pracowników Wydziału Biologii UAM prowadzone na kontynencie afrykańskim pt „*Afryka okiem Biologa*” wystawianą na terenie Term Maltańskich w Poznaniu, Ogrodu Botanicznego

Aneta Piechalak

Złącznik 2: Autoreferat

UAM oraz w *Collegium Biologicum*. Na terenie Wydziału Biologii w 2017 roku zorganizowałam wystawę prac malarskich o tematyce przyrodniczej autorstwa J. Kaczmarczyk Piotrowskiej pt. „Asymilacje”. Czynnie brałam udział w przygotowaniu materiałów reklamowych i promocyjnych Wydziału Biologii publikowanych w formie folderów, ulotek, pocztówek oraz na portalach internetowych.

W latach 2007-2012 r. byłam członkiem zespołu ds. promocji Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Z nadania Dziekana Wydziału Biologii od 2013 kieruję pracami Zespołu. Za pracę na rzecz Wydziału Biologii UAM w Poznaniu byłam czterokrotnie nagradzana przez Dziekana Wydziału Biologii. Szczegółowy wykaz działalności dydaktycznej, organizacyjnej oraz popularyzatorskiej został przedstawiony w Załączniku 4.

