

USE OF *IN VITRO* CULTURE FOR RISK ASSESSMENT OF PAHS IN PLANTS

VYUŽITÍ *IN VITRO* KULTUR PRO POSOUZENÍ VLIVU PAHS NA ROSTLINY

Váňová L., Kummerová M.

Ústav experimentální biologie rostlin, Oddělení fyziologie a anatomie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika.

E-mail: vanoval@sci.muni.cz, kumerova@sci.muni.cz

ABSTRACT

The effect of increasing concentration (0.1, 1 and 5 mg.l⁻¹) of fluoranthene (FLT) and the duration of exposure (7, 14 and 21 days) on the growth and net photosynthesis rate in pea plants (*Pisum sativum* L., cv. Garde) cultivated *in vitro* was investigated. The obtained results demonstrated significant influence of dry weight and shoot length of plants by higher concentration of FLT (1 and 5 mg.l⁻¹). The lowest applied concentration 0.1 mg.l⁻¹ of FLT significantly increased both growth parameters. The net photosynthesis rate was significantly decreased by increasing concentration of FLT (0.1, 1 a 5 mg.l⁻¹) in the environment.

Key words: fluoranthene, pea plants, *in vitro*, growth parameters, photosynthesis

ABSTRAKT

Byl sledován vliv zvyšující se koncentrace (0.1, 1 a 5 mg.l⁻¹) fluoranthenu (FLT) a doby expozice (7, 14 a 21 dní) na růst a rychlost čisté fotosyntézy u hrachu setého (*Pisum sativum* L., cv. Garde) kultivovaného v *in vitro* podmínkách. Získané výsledky dokládají významné snížení sušiny a délky nadzemní části rostlin vyššími koncentracemi FLT (1 a 5 mg.l⁻¹). Nejnižší aplikovaná koncentrace 0.1 mg.l⁻¹ FLT oba růstové parametry významně zvýšila. Se snižující se koncentrací FLT (0.1, 1 a 5 mg.l⁻¹) v prostředí se rychlost čisté fotosyntézy významně snižovala.

Klíčová slova: fluoranthen, hrách setý, *in vitro*, růstové parametry, fotosyntéza

ÚVOD

V moderním ekosystému se množství polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) neustále zvyšuje (Bryselbout et al., 2000). PAHs jsou značně heterogenní skupinou persistentních organických polutantů (POPs, *Persistent Organic Pullutants*) s environmentálně významnými vlastnostmi (odolnost vůči degradaci, schopnost bioakumulace v lipidových složkách živých organismů a toxicita). Tyto lipofilní sloučeniny jsou přítomny v prostředí ve všech složkách – ve vzduchu, ve vodě

i v sedimentech. Jejich zastoupení v jednotlivých složkách však není rovnoměrné. Důležitou roli v koloběhu PAHs v prostředí hraje terestrická vegetace, která pokrývá asi 80% povrchu Země (Kocourek et al., 2003). Rostliny disponují schopností tyto látky z prostředí přijímat, přičemž ke kontaminaci může dojít třemi dílčími mechanismy – plynnou depozicí, depozicí částic a mokrou depozicí rozpuštěných látek (Kocourek et al., 2003). Dále jsou schopny tyto sloučeniny translokovat, transformovat a akumulovat.

Ze studií, které se v minulosti zabývaly osudem xenobiotik v rostlinném organismu, vyplývá, že PAHs mohou být v rostlinách translokovány akropetálně (Kolb and Harms, 2000) i bazipetálně (Trapp et al., 1990). Transport PAHs je limitován především jejich hydrofóbními vlastnostmi a hodnotou K_{OW} (rozdělovací koeficient oktanol/voda) (Kummerová, 1997).

PAHs mohou v závislosti na délce expozice a dosažené koncentraci vyvolat akutní, chronické nebo latentní poškození rostlin, zvláště v kombinaci s jinými environmentálními faktory (Kmentová, 2003). PAHs ovlivňují všechna stadia růstu rostlin, od klíčení až po reprodukci (Kummerová, 1997). Kritickými etapami vývoje jsou především raná stadia ontogeneze, tj. klíčení semen a elongace kořene (Baud-Grasset et al., 1993). Právě schopnost semene vyklíčit může být důležitým znakem pro posouzení fytoxicity dané látky, což může mít za následek rozšíření daného druhu v přírodě (Kmentová, 2003).

PAHs mohou ovlivňovat biochemické a fyziologické procesy rostlin, rozhodující kvalitativně i kvantitativně o tvorbě biomasy (Lewis, 1995). Rostliny, jako fotoautotrofní organismy, jsou schopny získávat veškerou energii pro své metabolické procesy ze slunečního záření a uhlík z anorganické sloučeniny CO_2 . Fotosyntetická asimilace CO_2 je intenzivně studována na úrovni listů, celých rostlin či celých porostů (Gloser, 1998). Hlavní pozornost při tomto studiu není obvykle zaměřena na poznání vlastní podstaty asimilačních procesů, ale spíše na hledání vnitřních a vnějších faktorů omezujících rychlost fotosyntézy intaktních rostlin v přirozeném prostředí. Je obtížné stanovit vztah mezi fotosyntézou listů a produktivitou rostlin. Množství sušiny pravděpodobně odráží efektivitu fotosyntetických procesů rostlin (Delgado et al., 1992). Nejčastěji je fotosyntéza sledována pomocí měření rychlosti příjmu CO_2 do listů. Odhad rychlosti fotosyntézy z měření rychlosti výměny plynů (gazometrické metody) je komplikován respiračními procesy v mitochondriích, které probíhají i na světle a jsou též spojeny s výměnou plynů. Pomocí gazometrie nemůžeme měřit skutečnou rychlost fixace CO_2 v chloroplastech (hrubá fotosyntéza), ale pouze rychlost čisté fotosyntézy, což je rychlost hrubé fotosyntézy zmenšená o rychlost současně probíhajících respiračních procesů spojených s výdejem CO_2 a s příjmem kyslíku.

Na počátku vývoje rostlina ještě nedisponuje dostatečnými detoxikačními schopnostmi a dochází vlivem zvýšených nutričních požadavků k vysokému zatížení těmito sloučeninami. Z tohoto důvodu jsme se zabývali posouzením toxikologické významnosti krátkodobého působení PAHs (FLT) na rostlinný organismus na počátku ontogeneze.

Růstové a diferenciační pochody rostlin jsou primárně koordinovány systémem přirozených endogenních regulátorů růstu. Informace o vztahu PAHs a růstových regulátorů jsou pouze ojedinělé. Výsledky publikované v tomto příspěvku (růstové parametry a měření

rychlosti čisté fotosyntézy) jsou součástí obsáhlejšího pokusu, který je zaměřen právě na posouzení vztahu mezi xenobiotiky a růstovými regulátory.

MATERIÁL A METODIKA

Použitým rostlinným materiálem byl hrách setý (*Pisum sativum* L., cv. Garde) kultivovaný v *in vitro* podmínkách.

Fluoranthen (FLT; Supelco, USA) byl rozpuštěn v acetonu (Labscan, Ireland) na koncentraci 500 mg/L. Zásobní roztok FLT byl přidán do MS kultivačního média (Murashige and Skoog, 1962) v poměru 1:100 (v/v). Výsledná koncentrace FLT v médiu byla 0.1, 1 a 5 mg/L. Kultivační médium obsahovalo růstové regulátory, kyselinu indolyl-3-máselnou (IAA, 0.1 mg/L) a nebo kombinaci IAA (0.1 mg/L) a N₆-benzylaminopurinu (BA, 0.1 mg/L). Médium bylo upraveno na pH 5.5-5.7. Kontrolní rostliny byly kultivovány na stejném médiu (IAA nebo IAA+BA) bez přítomnosti FLT. Použitá koncentrace acetonu, jako rozpouštědla, neovlivnila klíčení semen, růst klíčnicích rostlin a další fyziologické parametry (primární procesy fotosyntézy) (Kummerová a Kmentová, 2004).

Klíčení semen hrachu probíhalo ve sterilních nádobách ve tmě, při teplotě 18±0.5°C. Apikální segmenty byly odříznuty ze 7-i denních klíčnicích rostlin. Tyto segmenty byly umístěny po šesti do 175 ml skleněných nádob (Magenta, Sigma) obsahující 20 ml příslušného kultivačního média. Experimentální varianty byly IAA a IAA+BA (kontroly), IAA+FLT (0.1, 1 a 5 mg/L) a IAA+BA+FLT (0.1, 1 a 5 mg/L). Kultury byly pěstovány při ozáření 40 μmol.m⁻².s⁻¹, fotoperiodě 16/8 a teplotě 25±1°C.

Hmotnost sušiny nadzemní části a kalusu a délka nadzemní části rostlin hrachu byla hodnocena, jako průměr ze šesti opakování každé varianty, po 7, 14 a 21 dnech kultivace. Rostliny byly změřeny, rozděleny na nadzemní část a kalus a následně sušeny při teplotě 80°C po dobu 2 hodin. Poté byla zvážena hmotnost sušiny.

Rychlost čisté fotosyntézy byla vypočtena z měření výměny CO₂. Při měření byl použit otevřený systém s infračerveným plynovým analyzátozem. Vztah mezi rychlostí čisté fotosyntézy a ozáření (PPFD; μmol.m⁻².s⁻¹) byl měřen ve skleněných kultivačních nádobách. Rostliny hrachu kultivované *in vitro* měly malé listy, a proto byla rychlost čisté fotosyntézy měřena na celé nadzemní části. Nádoby byly průběžně provzdušňovány a byla kontrolována teplota (24±2°C) a ozáření (Li-190, Licor, USA). Vzduch vstupující do nádobek byl přijímán z venkovního prostředí s relativní vlhkostí 80%. Množství vstupujícího CO₂ bylo průběžně sledováno. Zdrojem záření byla 1kW halogenová lampa. Negativní vliv infračerveného záření byl eliminován 10 cm vrstvou vodního filtru. Výsledky měření jsou průměry ze šesti nádobek z každé varianty.

Pro statistické zhodnocení výsledků byl použit program Statistica 6 (StatSoft, Inc.[®], USA). Při statistickém srovnání hodnot parametrů každé varianty byla nejprve testována normalita rozložení dat a homogenita rozptylů. Po prokázání normality rozložení a homogenity byla použita jednocestná analýza rozptylu (ANOVA, P=0.05, Tukey nebo

Scheffé test). Při nesplnění vstupních předpokladů bylo srovnání provedeno neparametrickými testy (Kruskal-Wallis test).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V laboratorních i polních studiích byly prokázány negativní vlivy PAHs jak na živočišných, tak i na rostlinných organismech. Proto jsou tyto látky považovány za (potenciálně) škodlivé pro zdravý vývoj ekosystému a jejich dlouhodobě neregulovaná produkce do životního prostředí se považuje za neslučitelnou s konceptem trvale udržitelného rozvoje.

V současné době jsou studována kritéria pro včasnou diagnostiku vlivu toxikantů na rostliny. Pozornost se zaměřuje na změny v biochemických a fyziologických procesech, které mohou předcházet vizuálnímu poškození rostlin. Jak již bylo zmíněno v úvodu, k účinkům většiny environmentálních polutantů patří inhibice fotosyntézy, a proto je fotosyntetická aktivita často využívána jako bioindikátor vlivu kontaminantů. Z tohoto důvodu byla gazometrická metoda měření rychlosti čisté fotosyntézy využita pro posouzení vlivu FLT na rostliny hrachu.

Fluoranthén patří k nejčastěji se vyskytujícím PAHs v prostředí a je označován jako indikátor výskytu ostatních PAHs. Je látkou toxickou bez přímých mutagenních účinků. Použitá koncentrace FLT 0.1 a 1 mg/L simuluje mírně zvýšené zatížení prostředí. Nejvyšší aplikovaná koncentrace 5 mg/L představuje silně kontaminované prostředí.

Kultivační médium kontrolních variant obsahovalo 0.1 mg/L IAA nebo kombinaci 0.1 mg/L IAA a 0.1 mg/L BA. V médiu bez BA se vytváří menší kalus, z něhož se regenerují adventivní kořeny. V přítomnosti BA se vytváří větší kalus i nadzemní část a netvoří se kořeny (obr. 1).



Obr. 1 Kontrolní rostliny kultivované na médiu s IAA (vlevo) a IAA+BA (vpravo).

Produkce sušiny je spolehlivým vnějším ukazatelem vnitřního ovlivnění jednotlivých rostlinných orgánů. Změny v délce nadzemní části a sušiny kalusu a nadzemní části rostlin, zjištěné v našem experimentu, závisí na koncentraci FLT a délce kultivace v MS médiu. Redukovaná délka nadzemní části a snížení její hmotnosti po 14 a 21 dnech kultivace v prostředí s 1 mg/L a zejména s 5 mg/L FLT jsou dokladem negativního vlivu této PAH sloučeniny na růst rostlin. Negativní vliv PAHs byl prokázán *in vivo* řadou jiných autorů

(Duxbury et al., 1997; Henner et al., 1999). Lze předpokládat, že významné snížení hmotnosti kalusu, oproti nadzemní části, zjištěné již po 7 dnech kultivace v živném médiu s FLT (1 a 5 mg/L), souvisí s bezprostředním vlivem FLT na jeho utváření. Stimulační vliv nízkých koncentrací xenobiotik, prokázány i dalšími autory (Wild a Jones, 1992; Kummerová et al., 1995), je patrný z významného zvýšení hmotnosti sušiny kalusu i nadzemní části hrachu kultivovaného *in vitro* s 0.1 mg/L FLT (tab. 1).

Tab. 1 Hmotnost sušiny nadzemní části a kalusu a délka nadzemní části rostlin hrachu kultivovaných *in vitro*.

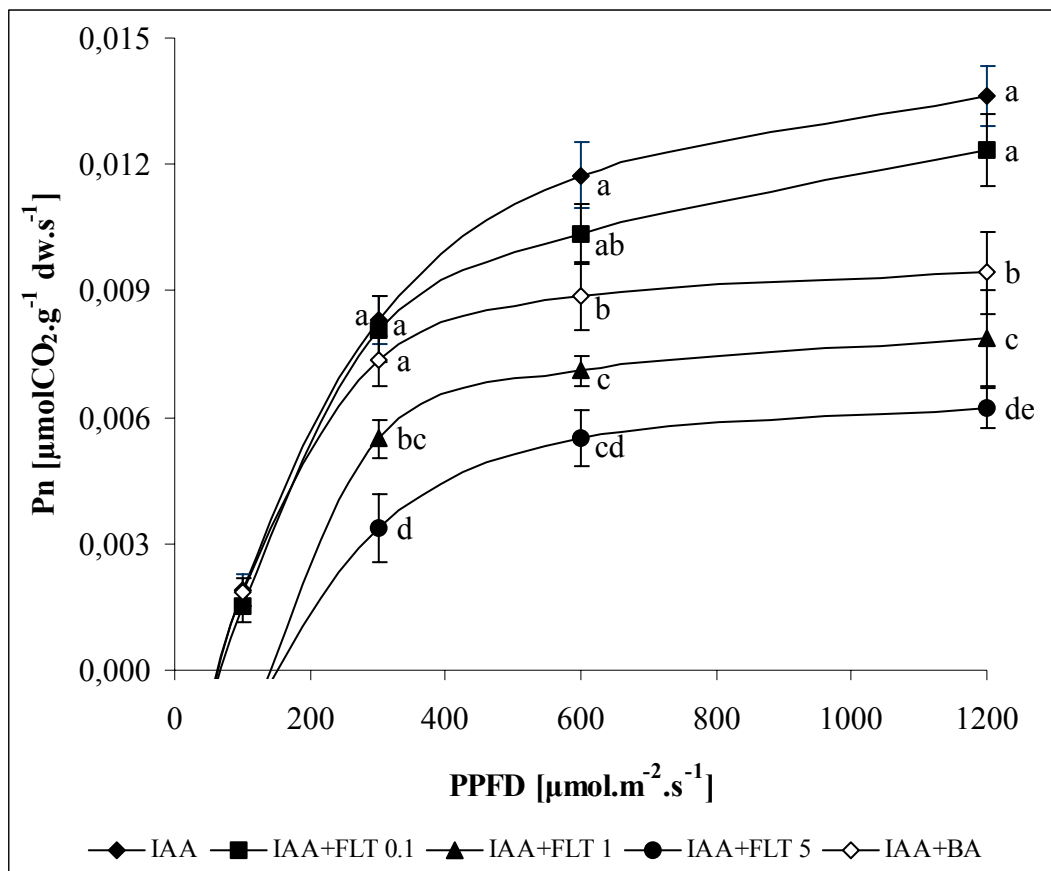
Doba kultivace (dny)	Varianta	Hmotnost sušiny (mg)		Délka (mm)
		Nadzemní část	Kalus	
7	IAA	3,929 ± 0,372 ^{ab}	1,889 ± 0,265 ^a	no detected
	IAA+FLT (0.1)	4,450 ± 0,345 ^{abc}	2,050 ± 0,105 ^a	
	IAA+FLT (1)	3,800 ± 0,469 ^{abc}	1,333 ± 0,121 ^d	
	IAA+FLT (5)	3,300 ± 0,219 ^c	1,233 ± 0,163 ^d	
	IAA+BA	3,750 ± 0,420 ^{ac}	2,894 ± 0,380 ^b	
	IAA+BA+FLT (0.1)	4,317 ± 0,319 ^b	3,383 ± 0,387 ^c	
	IAA+BA+FLT (1)	3,350 ± 0,418 ^c	1,850 ± 0,321 ^a	
	IAA+BA+FLT (5)	3,417 ± 0,422 ^{ac}	1,900 ± 0,063 ^a	
14	IAA	3,844 ± 0,243 ^a	2,178 ± 0,418 ^a	23,94 ± 1,11 ^{ab}
	IAA+FLT (0.1)	4,683 ± 0,376 ^b	2,695 ± 0,195 ^{ab}	25,50 ± 2,66 ^{bc}
	IAA+FLT (1)	4,217 ± 0,431 ^{ab}	1,433 ± 0,175 ^e	26,83 ± 0,98 ^c
	IAA+FLT (5)	3,817 ± 0,133 ^a	1,333 ± 0,151 ^e	22,17 ± 0,98 ^{ae}
	IAA+BA	4,533 ± 0,329 ^b	3,506 ± 0,499 ^{cd}	26,28 ± 0,83 ^c
	IAA+BA+FLT (0.1)	4,650 ± 0,187 ^b	4,067 ± 0,175 ^d	29,83 ± 2,48 ^d
	IAA+BA+FLT (1)	4,483 ± 0,454 ^b	3,050 ± 0,451 ^{bc}	29,33 ± 0,52 ^d
	IAA+BA+FLT (5)	3,667 ± 0,459 ^a	2,300 ± 0,374 ^a	20,50 ± 0,84 ^e
21	IAA	5,022 ± 0,778 ^a	2,292 ± 0,365 ^a	35,56 ± 1,82 ^a
	IAA+FLT (0.1)	6,167 ± 0,186 ^b	3,040 ± 0,258 ^b	37,50 ± 2,07 ^a
	IAA+FLT (1)	5,133 ± 0,468 ^a	1,767 ± 0,137 ^{ae}	32,33 ± 1,03 ^{cd}
	IAA+FLT (5)	4,150 ± 0,308 ^{cd}	1,533 ± 0,234 ^e	26,17 ± 0,98 ^b
	IAA+BA	5,022 ± 0,449 ^a	3,849 ± 0,563 ^c	33,28 ± 1,56 ^d
	IAA+BA+FLT (0.1)	5,683 ± 0,319 ^{ab}	4,797 ± 0,377 ^d	34,33 ± 3,61 ^{ad}
	IAA+BA+FLT (1)	4,733 ± 0,432 ^{ad}	3,233 ± 0,207 ^b	29,67 ± 0,82 ^c
	IAA+BA+FLT (5)	3,483 ± 0,232 ^c	3,050 ± 0,214 ^a	26,00 ± 0,89 ^b

Hodnoty experimentálních variant po stejné době expozice označné stejným písmenem (horní indexy) se statisticky významně neliší.

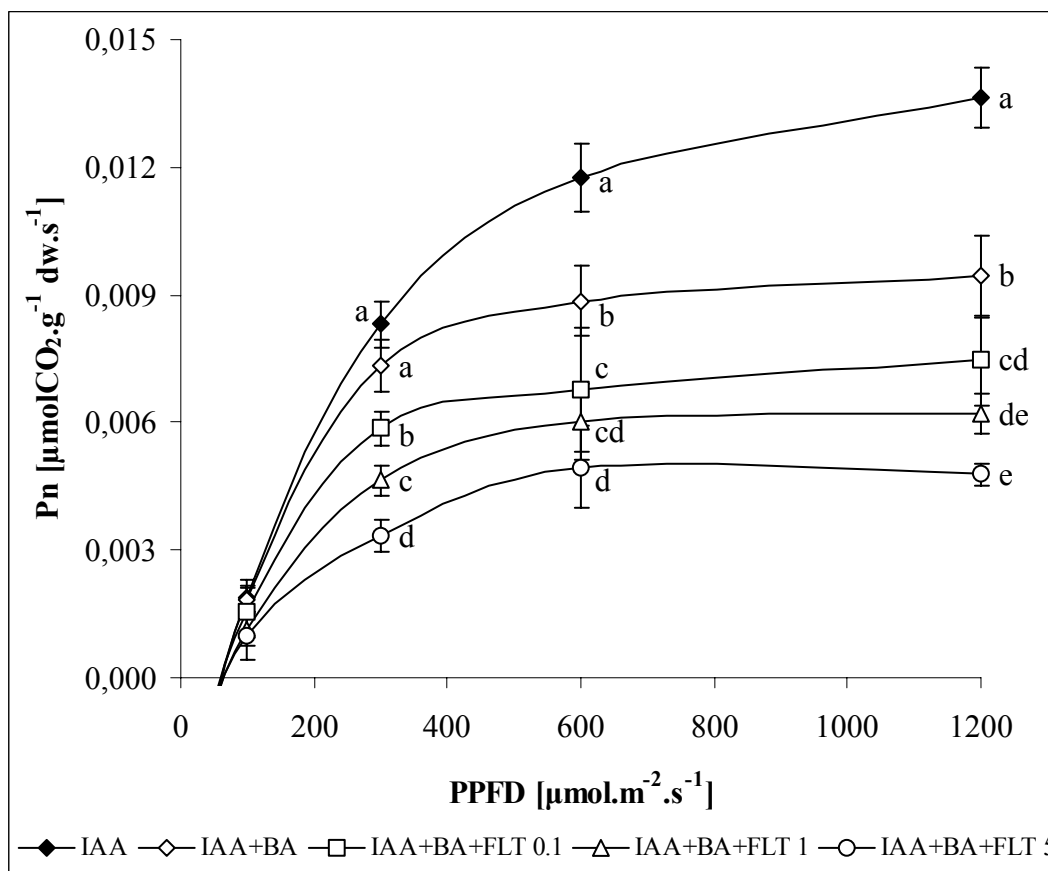
Délka nadzemní části rostlin hrachu byla hodnocena po 14 a 21 dnech kultivace. Ze zjištěných výsledků vyplývá jednoznačný stimulační vliv nejnižší aplikované koncentrace 0.1 mg/L FLT. Koncentrace 1 mg/L FLT po 14 dnech kultivace délku nadzemní části významně stimulovala, avšak po 21 dnech významně inhibovala. Nejvyšší aplikovaná koncentrace 5 mg/L FLT po 14 a 21 dnech kultivace rostlin délku nadzemní části významně inhibovala (tab. 1).

Vliv FLT (0.1, 1 a 5 mg/L) na rychlost čisté fotosyntézy byl hodnocen po 21 dnech kultivace. Se zvyšující se ozářeností (100, 300, 600 a 1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se rychlost čisté fotosyntézy ($\mu\text{molCO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{dw}\cdot\text{s}^{-1}$) rostlin všech pokusných variant (IAA, IAA+FLT 0.1, IAA+FLT 1, IAA+FLT 5, IAA+BA+FLT 0.1, IAA+BA+FLT 1, IAA+BA+FLT 5) zvyšovala (graf 1, 2). U rostlin ovlivněných FLT (0.1, 1 a 5 mg/L) byly zjištěny významně nižší hodnoty světelné křivky fotosyntézy. Se zvyšující se koncentrací FLT v prostředí se rychlost čisté fotosyntézy významně snižovala. Toto snížení bylo patrné po celou dobu měření.

Graf 1 Rychlost čisté fotosyntézy rostlin hrachu pěstovaných v médiu s IAA (kontrola) a IAA+FLT (0.1, 1 a 5 mg/L).



Graf 2 Rychlost čisté fotosyntézy rostlin hrachu pěstovaných v médiu s IAA+BA(kontrola) a IAA+BA+FLT (0.1, 1 a 5 mg/L).



Rychlost fotosyntézy při vzestupu ozáření nad kompenzační úroveň se zpočátku zvyšovala téměř lineárně, později se však zpomalovala a dále již nevzrůstala. Počátek křivky leží u takové hodnoty ozáření, při které rychlost hrubé fotosyntézy je právě dostatečná na kompenzaci současně probíhající respirace. Tato hodnota je označována jako kompenzační ozáření (světelný kompenzační bod). Hodnota ozáření, při které došlo k nasycení fotosyntézy zářením, je nazývána saturační ozáření (Gloser, 1998). V našem experimentu hodnota saturační ozáření dosáhla $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (graf 1, 2).

Ze získaných výsledků jednoznačně vyplývá, že se zvyšující se koncentrací FLT v prostředí se rychlost čisté fotosyntézy rostlin hrachu významně snižovala. Zjištěný pokles rychlosti čisté fotosyntézy souvisí s již dříve prokázaným vlivem FLT na primární procesy fotosyntézy, snížením obsahu fotosyntetických pigmentů (Kummerová et al., 2001), změnami hodnot parametrů fluorescence chlorofylu (Kummerová et al., 2006a) a změnou aktivity Hillovy reakce (Kummerová et al., 2006b).

ZÁVĚR

Cílem práce bylo posouzení vlivu zvyšující se koncentrace (0.1, 1 a 5 mg/L) fluoranthenu a doby jejího působení na růstové parametry a rychlost čisté fotosyntézy

u rostlin hrachu kultivovaných *in vitro*. Získané výsledky dokládají stimulační vliv nejnižší aplikované koncentrace 0.1 mg/L FLT na produkci biomasy a délku nadzemní části. Nejvyšší aplikovaná koncentrace 5 mg/L FLT způsobila významnou inhibici obou sledovaných růstových parametrů. Bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací FLT v prostředí se rychlost čisté fotosyntézy rostlin hrachu významně snižovala.

LITERATURA

Baud-Grasset F., Baud-Grasset S., Safferman S.I. (1993): Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*, 7: 1365-1374.

Bryselbout C., Henner P., Carsignol J., Lichtfouse E. (2000): Polycyclic aromatic hydrocarbons in highway plants and soils. Evidence for a local distillation effect. *Analisis*, 28 (4): 290-293.

Delgado E., Azcón-Bieto J., Aranda X., Palazón J., Medrano H. (1992): Leaf Photosynthesis and Respiration of High CO₂-Growth Tobacco Plants Selected for Surfoval under CO₂ Compensation Point Conditions. *Plant Physiology*, 98: 949-954.

Duxbury C.L., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1997): Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1739-1748.

Gloser J. (1998): Fyziologie rostlin. Skriptum. Přírodovědecká fakulta MU. Brno. 158 pp.

Henner P., Schiavon M., Druelle V., Lichtfouse E. (1999): Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic Geochemistry*, 30: 963-969.

Kmentová E. (2003): Response of plant to fluoranthene in environment. Ph.D. thesis No. 24. Masaryk University, Brno, CZ. 137 pp.+8 příloh.

Kocourek V., Hajšlová J., Tomaniová M. (2003): Přehled imisní zátěže agrárního ekosystému vybranými prioritními organickými polutanty. Projekt VVF: PROJ/2002/10/deklas, Praha.

Kolb M., Harms H. (2000): Metabolism of fluoranthene in different plant cell cultures and intact plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 1304-1310.

Kummerová M., Slovák L., Holoubek I. (1995): Phytotoxicity studies of benzo[*a*]pyrene with *Lactuca sativa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 51: 197-203.

Kummerová M., Slovák L., Holoubek I. (1997): Growth response of spring barley to short- or long-period exposures to fluoranthene. *Rostlinná výroba*, 43 (5): 209-215.

Kummerová M., Kmentová E., Koptíková J. (2001): Effect of fluoranthene on growth and primary processes of photosynthesis in faba bean and sunflower. *Rostlinná Výroba*, 47 (8): 344-351.

Kummerová M., Kmentová E. (2004): Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plants seedling. *Chemosphere*, 56: 387-393.

Kummerová M., Krulová J., Zezulka Š., Tříška J. (2006a): Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere*, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.01.052 (published online).

Kummerová M., Barták M., Dubová J., Tříška J., Zubrov, E., Zezulka Š. (2006b): Inhibitory effect of fluoranthene on photosynthetic processes in lichens detected by chlorophyll fluorescence. *Ecotoxicology*, 15 (2): 121-131.

Lewis M.A. (1995): Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environmental Pollution*, 87: 319-336.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Trapp S., Matthies M., Scheunert I., Topp E.M. (1990): Modeling the bioconcentration of organic chemicals in plants. *Environmental Science & Technology*, 24: 1246-1252.

Wild S.R, Jones K.C. (1992): Polynuclear aromatic hydrocarbon uptake by carrots grown in sludge-amended soil. *Journal of Environmental Quality*, 21: 229-249.