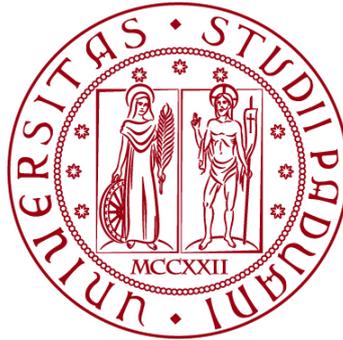


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

FITORISANAMENTO DI AREE CONTAMINATE DA PFAS

Tutor: Dott.ssa Marianna Pauletto
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Laureando: Francesco Zandonà

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	2
1. STATO DELL'ARTE	3
1.1. <i>PFAS: caratteristiche chimico-fisiche, applicazioni ed esposizione dell'uomo e degli ecosistemi</i>	3
1.2. <i>Tossicità dei PFAS</i>	3
1.3. <i>Pratiche convenzionali di bonifica di aree contaminate da PFAS</i>	4
1.4. <i>Fitorisanamento di aree contaminate da PFAS: meccanismi, vantaggi e svantaggi</i>	5
1.5. <i>Aspetti generali dell'assorbimento dei PFAS da parte delle piante</i>	6
2. MATERIALI E METODI	7
2.1. <i>Utilizzo di Juncus sarophorus come potenziale pianta per il fitorisanamento di aree contaminate da PFAS (Zhu et al., 2022)</i>	7
2.1.1. <i>Esperimento in serra: condizioni di crescita delle piante</i>	7
2.1.2. <i>Raccolta e analisi dei campioni</i>	7
2.1.3. <i>Analisi dei dati: BAFs e TFs</i>	8
2.2. <i>Studio del meccanismo e processo di assorbimento e della distribuzione subcellulare dei PFAS nella pianta Alisma Orientale al fine di valutarne il potenziale di fitorisanamento (Wang et al., 2020)</i>	8
2.2.1. <i>Preparazione delle piante</i>	9
2.2.2. <i>Esperimenti eseguiti in idroponica</i>	9
2.2.3. <i>Estrazione, determinazione e analisi mediante TEM</i>	10
2.2.4. <i>Analisi dei dati: calcolo della concentrazione e velocità di assorbimento</i>	11
3. RISULTATI	12
3.1. <i>Utilizzo di Juncus sarophorus come potenziale pianta per il fitorisanamento di aree contaminate dai PFAS (Zhu et al., 2022)</i>	12
3.1.1. <i>Assorbimento dei PFAS da parte della pianta</i>	12
3.1.2. <i>BAFs e TFs</i>	13
3.2. <i>Studio del meccanismo e processo di assorbimento e della distribuzione subcellulare dei PFAS nella pianta Alisma Orientale al fine di valutarne il potenziale di fitorisanamento (Wang et al., 2020)</i>	14
3.2.1. <i>Assorbimento dei PFAS da parte della pianta</i>	14
3.2.2. <i>Distribuzione subcellulare dei PFAS nelle radici delle piante</i>	16
3.2.3. <i>La dissipazione dei PFAS nelle radici delle piante</i>	18
3.2.4. <i>Visualizzazione della distribuzione a livello cellulare</i>	19
4. DISCUSSIONE	20
BIBLIOGRAFIA	21

ABSTRACT

La contaminazione di terreni sia agricoli che urbani e delle acque circostanti tali aree rappresenta un grosso pericolo a livello globale per la salute umana e animale. In particolare, tra i numerosi inquinanti organici, le sostanze perfluoroalchiliche e polifluoroalchiliche (PFAS) costituiscono una seria minaccia per l'uomo, grazie alla loro particolare resistenza alla degradazione, alla loro tossicità e al loro largo impiego in prodotti industriali e commerciali. È nata così l'esigenza di trovare delle soluzioni che permettano la bonifica di tali aree contaminate; in particolare il fitorisanamento ha fornito delle alternative promettenti rispetto alle tecnologie convenzionali di bonifica, grazie ai bassi costi, alla ridotta manutenzione e alla sostenibilità di tale tecnica. L'utilità di tale tecnica è evidenziata da numerosi studi che dimostrano il grande potenziale di fitorisanamento di alcune piante, in particolare quelle specie tipiche delle zone umide e delle paludi. In questa tesi verranno analizzati e discussi nello specifico due studi (Zhu et al., 2022) (Wang et al., 2020) che prendono in esame due piante (*Juncus sarophorus* e *Alisma orientale*), con lo scopo di poter applicare o migliorare approcci di fitorisanamento di aree contaminate dai PFAS.

1. STATO DELL'ARTE

1.1. *PFAS: caratteristiche chimico-fisiche, applicazioni ed esposizione dell'uomo e degli ecosistemi*

Le sostanze perfluoroalchiliche e polifluoroalchiliche (PFAS) sono una famiglia di oltre 4.700 molecole di origine sintetica composte da una catena di carbonio che può essere lineare o ramificata e totalmente o parzialmente fluorurata e da gruppi funzionali terminali. Queste molecole presentano delle caratteristiche chimico-fisiche uniche che hanno permesso il loro successo in varie applicazioni industriali e commerciali. Si tratta infatti di composti con un'elevata stabilità termica e chimica che è loro conferita dalla maggiore dimensione dell'atomo di fluoro rispetto all'atomo di idrogeno e grazie alla forza del legame carbonio-fluoro. Presentano inoltre una bassa tensione superficiale acquosa e la proprietà di interagire con l'acqua e con fasi non polari, mostrando quindi un comportamento anfipatico (Ghisi et al., 2019). Altre peculiarità di queste sostanze sono la loro natura non infiammabile, una grande capacità di dissolvere i gas e una buona conducibilità termica. Grazie alle loro proprietà i PFAS sono utilizzati come surfactanti, in prodotti contenenti rivestimenti antiaderenti, antimacchia e resistenti all'acqua come imballaggi, abbigliamento, tappeti, tessuti per esterni e attrezzature sportive, cere per sci e snowboard, pentole antiaderenti, detersivi e ammorbidenti, lucidi e cere e vernici in lattice, pesticidi ed erbicidi, fluidi idraulici, tergicristalli, pitture, coloranti e inchiostri, adesivi, prodotti medici, prodotti per la cura personale ed infine, grazie alle loro proprietà ignifughe, sono ampiamente utilizzati nelle schiume antincendio (Evangelou & Robinson, 2022). La grande versatilità di queste molecole, la loro stabilità e il loro carattere anfipatico hanno permesso la loro diffusione, accumulo e persistenza nell'ambiente. Queste molecole, infatti, si ritrovano in aree trattate con schiume antincendio, negli effluenti che provengono da impianti di trattamento delle acque reflue, in corpi idrici a causa della loro mobilitazione nelle discariche, negli ammendanti con fanghi di depurazione o biosolidi in fibra di carta. Le principali fonti di esposizione dell'uomo invece sono gli alimenti e l'acqua contaminati, ma anche l'aria e la polvere sospesa nell'aria, gli imballaggi per alimenti e le pentole rappresentano un'importante fonte di esposizione secondaria (Ghisi et al., 2019).

1.2. *Tossicità dei PFAS*

L'impiego dei PFAS ad ampio spettro, combinato con la loro elevata persistenza ambientale ed emivita biologica, ha causato un'elevata esposizione dell'uomo a queste molecole e alla loro presenza nel sangue di quasi l'intera popolazione nei

paesi sviluppati, con conseguenti effetti sulla salute segnalati a livello globale. Tali sostanze si accumulano principalmente nel sangue, fegato e reni e possono causare una serie di effetti sulla salute umana; possono per esempio alterare la funzione immunitaria e tiroidea, causare malattie a livello renale ed epatico, compromettere la regolazione dei lipidi e dell'insulina, ostacolare la riproduzione e i processi dello sviluppo, indurre cancro (Fenton et al., 2021).

1.3. Pratiche convenzionali di bonifica di aree contaminate da PFAS

Vista la vasta distribuzione dei PFAS nell'ambiente, sono state sviluppate nel tempo una serie di pratiche per la detossificazione delle aree contaminate.

Uno degli approcci più utilizzati per rimuovere i PFAS dalle acque è l'assorbimento e la stabilizzazione di queste sostanze nel terreno tramite l'utilizzo di assorbenti, tale tecnica prevede elevati costi operazionali e di manutenzione e richiede frequenti rigenerazioni. Un'altra tecnica efficiente è la filtrazione (nanofiltrazione o osmosi inversa) di acque contaminate utilizzando membrane ad alta pressione e resine a scambio ionico, tuttavia il limite di questo approccio risiede nel trattamento e smaltimento delle membrane e del concentrato altamente tossico che si viene a formare. Come alternativa possono essere utilizzati dei trattamenti termici nei quali i PFAS vengono vaporizzati riscaldando la matrice del suolo ad elevate temperature. Questo però causa contemporaneamente un'alterazione della comunità microbica e della struttura chimico-fisica del materiale del suolo, oltre ad essere una tecnologia non espandibile su grandi aree e complessa in termini di installazione, funzionamento e manutenzione delle infrastrutture. Esistono anche tecnologie fotochimiche e sonochimiche: le prime prevedono l'utilizzo di elettroni idratati generati da raggi UV mentre le seconde applicano radiazioni ultrasoniche; entrambe hanno come fine la distruzione di tali molecole. Il trattamento tramite fascio di elettroni, tuttavia, dipende molto dalla struttura e reattività della molecola, mentre l'efficienza della sonolisi dipende dalla presenza di altri contaminanti organici che, se presenti, riducono di molto le performance. Un altro approccio utilizzabile consiste nell'ossidazione chimica, ovvero nell'introduzione di un ossidante che reagisce con i PFAS e li trasforma in sottoprodotti non tossici e degradabili. Si tratta tuttavia di reazioni lente e il costo di tale approccio è molto elevato, con performance meteo-dipendenti. Le tradizionali tecniche di biodegradazione microbica, invece, hanno portato scarsi risultati a causa della elevata forza e stabilità del legame C-F. Recentemente sono stati introdotti altri metodi come l'utilizzo di idrogel parzialmente fluorurati oppure trattamenti specifici desunti da analisi *in silico* di tipo *machine learning* (Mayakaduwege et al., 2022).

1.4. Fitorisanamento di aree contaminate da PFAS: meccanismi, vantaggi e svantaggi

I metodi commerciali di bonifica di aree contaminate da PFAS, basati sulle tecniche convenzionali di cui sopra, sono disponibili solo per acque sotterranee e non per il suolo. Nasce così la necessità di sviluppare metodi di biorisanamento *in situ* che permettano la detossificazione del suolo contaminato da PFAS, da qui il perfezionamento e la messa in atto di approcci di fitorisanamento. Tale tecnica consiste nell'utilizzo di piante per l'assorbimento e il bioaccumulo di sostanze chimiche tossiche (Shahsavari et al., 2021). In base al tipo di contaminante, alla sua biodisponibilità e alle condizioni dell'area contaminata, le piante possono utilizzare diverse modalità di fitorisanamento. La fitoestrazione prevede l'assorbimento delle sostanze tossiche dal suolo o dall'acqua da parte delle radici e il successivo trasferimento di tali sostanze nella parte aerea della pianta e accumulo in tessuti che possono essere raccolti. Le piante inoltre possono stabilizzare o immobilizzare gli inquinanti nel suolo (fitostabilizzazione) o ancora possono trasferirli tramite lo xilema e rilasciarli nell'ambiente in forma volatili tramite traspirazione (fitovolatilizzazione). Gli inquinanti possono anche essere degradati e scomposti in forme meno tossiche tramite processi metabolici oppure tramite l'incorporazione in tessuti vegetali, si parla quindi di fitodegradazione. Infine abbiamo la rizofiltrazione dove i contaminanti vengono assorbiti o precipitati sulle radici o assorbiti nella rizosfera (Mayakaduwege et al., 2022). La tecnica del fitorisanamento possiede una serie di vantaggi rispetto al resto delle tecniche di bonifica. Oltre ai costi ridotti e alla sostenibilità di tale tecnica, permette il controllo dell'erosione del suolo con conseguente mantenimento del valore estetico del sito contaminato e della biodiversità. Si tratta inoltre di una tecnica semplice, che richiede bassi costi per il personale e che permette il riutilizzo del materiale di scarto o il recupero dei contaminanti dalla biomassa in cui si sono accumulati (Mayakaduwege et al., 2022). Tuttavia se gli inquinanti raggiungono livelli fitotossici, le piante possono avere alterazioni morfologiche, biochimiche e molecolari, con conseguente impatto sulla loro crescita e sviluppo. Si potrebbe pertanto verificare, nel lungo periodo, una riduzione delle performance di fitorisanamento. Infine, un ultimo aspetto problematico consiste nel fatto che la capacità delle piante di rimuovere i contaminanti dipende dalla distribuzione delle radici, dalle condizioni climatiche e da fattori stagionali (Mayakaduwege et al., 2022).

1.5. Aspetti generali dell'assorbimento dei PFAS da parte delle piante

L'assorbimento dei PFAS da parte delle piante può essere descritto tramite l'utilizzo di due fattori: il fattore di bioaccumulo (BAF), che consiste nel rapporto tra la [PFAS] nelle piante e la [PFAS] nel suolo, e il fattore di traslocazione (TF) che invece consiste nel rapporto tra la [PFAS] nei germogli e la [PFAS] nelle radici (Evangelou & Robinson, 2022). L'assorbimento dei PFAS dipende molto dalle caratteristiche fisico-chimiche delle molecole in questione. I PFAS a catena corta, per esempio, mostrano un maggiore TF e quindi una maggiore trasferibilità dalle radici alle porzioni esterne della pianta mentre i PFAS a catena lunga difficilmente vengono trasportati verso le parti aeree, ma vengono facilmente assorbiti o bloccati dalla banda del Caspary, accumulandosi nelle radici. Anche il gruppo funzionale dei PFAS incide sul loro assorbimento: perfluorocarbossilati hanno un assorbimento potenziale maggiore rispetto ai perfluorosulfonati. Così come le caratteristiche chimico-fisiche dei PFAS incidono sul loro assorbimento, anche le caratteristiche fisiologiche della pianta hanno un ruolo fondamentale. Per esempio la traspirazione risulta molto importante, vi è infatti una correlazione diretta tra la velocità di traspirazione e l'assorbimento. Inoltre, poiché i PFAS per essere assorbiti e trasportati dalle piante devono poter oltrepassare delle barriere selettive di membrana, avremo un maggiore BAF per i compartimenti vegetativi rispetto agli organi riproduttivi o di riserva. Un altro fattore importante per l'assorbimento è la composizione delle piante, specialmente per quanto riguarda il contenuto in proteine. Oltre alle caratteristiche della pianta e dei PFAS, i fattori legati all'ambiente circostante influiscono molto sull'assorbimento di tali sostanze: la materia organica del suolo, la salinità, il pH e la temperatura sono fattori cruciali in questo contesto (Wang et al., 2020).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Utilizzo di *Juncus sarophorus* come potenziale pianta per il fitorisanamento di aree contaminate da PFAS (Zhu et al., 2022)

In questo studio condotto in Australia viene presa in considerazione la specie *Juncus sarophorus* con lo scopo di valutarne il potenziale di fitorisanamento in acque contaminate da PFAS. Questa pianta è stata scelta in quanto molto diffusa nelle paludi e zone umide del sud Australia e poiché presenta caratteristiche favorevoli come la sua natura perenne e l'elevata produzione in biomassa. L'esperimento è stato eseguito in serra, irrigando la pianta con differenti concentrazioni di tre dei PFAS più utilizzati a livello globale: l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS), l'acido perfluorooctanoico (PFOA) e l'acido perfluoroesansolfonico (PFHxS). Lo scopo dell'esperimento consiste nella valutazione dell'assorbimento, trasferimento e accumulo di tali sostanze all'interno della pianta.

2.1.1. Esperimento in serra: condizioni di crescita delle piante

Sono state utilizzate 36 piantine di *Juncus sarophorus*, ciascuna delle quali è stata fatta crescere in vasi da 1.5 L contenenti il suolo adatto alla loro crescita. Le piante sono state irrigate con acqua piovana priva di PFAS per 25 gg in modo tale da adattare le piante alle condizioni di crescita in serra, mantenendo un'umidità di circa il 60-70% della capacità di tenuta del suolo. Dopo i primi 25 gg le piante sono state irrigate con acqua piovana contenente PFAS e raggruppate in tre gruppi di trattamento: 0 µg/L (trattamento C0), 10 µg/L (C10) e 100 µg/L (C100) per ogni PFAS utilizzato, prevedendo 12 replicati per ogni trattamento. Le piante sono state fatte crescere sotto luce naturale ad una temperatura media di 18.9 °C e un'umidità media del 66% per 7 mesi (da aprile a novembre 2020). I campioni vegetali e del suolo sono stati raccolti nel gg 95, 150 e 190 andando anche a campionare il terreno dei vasi senza pianta al gg 95 per poter garantire la replicabilità delle misure dei PFAS nel suolo.

2.1.2. Raccolta e analisi dei campioni

Ad ogni evento di campionamento sono stati raccolti nove campioni, tre campioni di pianta intera per ogni gruppo di trattamento, e successivamente sono stati divisi in germogli e radici. In parallelo, il suolo è stato campionato dagli stessi vasi dai quali sono state estratte le piante includendo il terreno attaccato alle radici. Per una corretta analisi i tre campioni del suolo di ogni gruppo di trattamento sono stati mescolati. Il materiale vegetale è stato successivamente omogenizzato ed estratto con metanolo basificato a cui è seguita poi un'estrazione in fase solida.

L'analisi dell'acqua, del suolo e dell'estratto vegetale è stata eseguita tramite una cromatografia liquida accoppiata con una spettrometria di massa in tandem (LC-MS/MS) e l'analisi della [PFAS] nel materiale vegetale è stato riportato in peso umido e poi convertito in peso secco calcolando il contenuto di umidità.

2.1.3. Analisi dei dati: BAFs e TFs

Per studiare l'efficienza di assorbimento della pianta sono stati utilizzati due coefficienti: il fattore di bioaccumulo (1) e il fattore di trasferimento (2)

$$BAFs = C_{germoglio} \text{ o } C_{radice} / C_{suolo} \quad (1)$$

$$TFs = C_{germoglio} / C_{radice} \quad (2)$$

dove C_{radice} , $C_{germoglio}$ e C_{suolo} indicano rispettivamente la concentrazione dei PFAS (ng/g di peso secco) nelle radici, nei germogli e nel suolo. Il BAF dà una misura dell'efficienza di trasferimento del contaminante dal terreno della zona radicale alla pianta e, quindi, se maggiore di 1 indica un effettivo accumulo e trasferimento dei PFAS nei tessuti della pianta, mentre se minore di 1 abbiamo un accumulo preferenziale dei PFAS nel suolo rispetto alla pianta. Il TF permette di misurare la capacità di una pianta di trasferire i PFAS dalle radici ai germogli; quindi, per concentrazioni maggiori nei germogli rispetto alle radici avrò un valore di $TF > 1$ mentre nel caso contrario un $TF < 1$.

2.2. Studio del meccanismo e processo di assorbimento e della distribuzione subcellulare dei PFAS nella pianta *Alisma Orientale* al fine di valutarne il potenziale di fitorisanamento (Wang et al., 2020)

In questo studio viene utilizzata *Alisma Orientale*, una pianta tipica delle zone umide, già usata in approcci di fitorisanamento grazie al suo potenziale di accumulo di inquinanti. *A. orientale*, in particolare, è stata dimostrata essere una delle piante con la maggior capacità di accumulo e trasporto di due dei più famosi PFAS: PFOS e PFOA. Lo studio in questione prevede un totale di sei esperimenti in idroponica con il fine di esplorare il meccanismo di assorbimento, la distribuzione subcellulare e il processo di assorbimento di tali PFAS. La conoscenza del meccanismo e del processo di assorbimento di questi contaminanti risulta di fondamentale importanza per massimizzare l'efficienza di assorbimento e di accumulo dei PFAS. Studiando la distribuzione subcellulare dei contaminanti, invece, si ottengono informazioni riguardo la tolleranza della pianta a quel tipo di inquinante. Infatti l'accumulo di contaminanti negli organelli cellulari può provocare alterazioni della struttura e funzione dell'organello. Lo scopo di tale studio, quindi, consiste nel fornire le basi teoriche per possibili applicazioni future di *A. orientale* nel fitorisanamento di aree contaminate da questo tipo di

inquinanti. Per visualizzare in modo diretto la distribuzione a livello cellulare dei PFOS e PFOA nelle radici delle piante e per capire il processo di assorbimento, è stato utilizzato un microscopio elettronico a trasmissione equipaggiato con una spettroscopia a dispersione di energia (TEM-EDS) basandosi sull'identificazione dell'elemento F che non è un elemento costitutivo delle piante.

2.2.1. Preparazione delle piante

Ottenute le piante di *A. orientale* le radici sono state lavate con acqua corrente per eliminare il terreno e trasferite in una soluzione nutritiva per due settimane di acclimatazione. Successivamente sono state nuovamente trasferite in una soluzione nutritiva addizionata con PFOA e PFOS negli esperimenti successivi. Gli esperimenti in idroponica sono stati condotti in secchi di plastica da 1.2 L coperti con una sacca nera. Le piante sono state fissate nei fori del coperchio del secchio, che sono stati riempiti con una spugna per sostenere le piante. Ogni secchio, che contiene due piante, è stato riempito con 1,0 L di soluzione nutritiva. Solo le radici delle piante sono state esposte alla soluzione nutritiva. L'acqua traspirata dalle piante è stata misurata in peso e integrata con la soluzione nutritiva non addizionata.

2.2.2. Esperimenti eseguiti in idroponica

Sono stati eseguiti sei esperimenti; in ciascun esperimento sono state eseguite tre repliche per ogni trattamento. I campioni vegetali ottenuti in ogni esperimento, una volta raccolti, sono stati sciacquati con acqua corrente e acqua pura MilliQ per tre volte e asciugati con carta velina per poi estrarre e determinare PFOS e PFOA da ciascun campione. Il primo esperimento ha lo scopo di valutare l'assorbimento tempo-dipendente di PFOA e PFOS e prevede il trasferimento di piante di *A. orientale* della stessa altezza in una soluzione nutritiva contenente 1.0 mg/L di PFOS o PFOA. Successivamente ad intervalli di tempo di esposizione crescenti (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h) sono stati campionati i germogli e le radici delle piante. Nel secondo esperimento si è preso in esame l'assorbimento concentrazione-dipendente di PFOS e PFOA. Piante di *A. orientale* della stessa altezza sono state trasferite in una soluzione nutritiva addizionata con PFOS o PFOA a concentrazioni di 0.0, 100.0, 200.0, 400.0, 500.0, 800.0, e 1000.0 µg/L (pH = 6) per 8 h a cui è seguito il campionamento delle radici delle piante. Nel terzo esperimento invece si valuta l'effetto di inibitori metabolici, delle acquaporine e dei canali ionici sull'assorbimento. Ad una concentrazione fissata a 1.0 mg/L di PFOS o PFOA sono stati aggiunti tre inibitori: 0.5 mmol/L di 2,4-DNP come inibitore metabolico; 0.5 mmol/L di glicerolo e 0.5 µmol/L di AgNO₃ per inibire le acquaporine; infine 10 µmol/L di acido antracene-9-carbossilico (9-AC), 5 µmol/L di 4,4-diisotio-cianostilbene-2,2-disolfonato (DIDS) e 5 µmol/L di 5-nitro-2-(3-

fenilpropilamino)acido benzoico (NPPB) come inibitori dei canali ionici. Come controllo sono state utilizzate piante cresciute in soluzioni addizionate con PFOS o PFOA senza inibitori. Dopo un'esposizione di 8 h sono state campionate le radici delle piante. Nel quarto esperimento piante uniformi sono state piantate in una soluzione nutritiva addizionata con 1,0 mg/L di PFOS, 1,0 mg/L di PFOA o una miscela di 1,0 mg/L di PFOS e 1,0 mg/L di PFOA. Dopo 8 h di esposizione, le radici delle piante sono state campionate al fine di valutare la competizione di assorbimento tra PFOA e PFOS. Il quinto esperimento ha lo scopo di studiare la distribuzione subcellulare di PFOS e PFOA durante l'assorbimento: piante con altezza uniforme sono state trasferite in una soluzione nutritiva contenente 1.0 mg/L di PFOS o 1.0 mg/L di PFOA. Le piante sono state campionate a intervalli di tempo di esposizione crescenti (0, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 d) e suddivise in radici, steli e foglie per poi determinare PFOA e PFOS nei componenti subcellulari (ad es. pareti cellulari, frazione idrosolubile e organelli cellulari) di ciascun organo vegetale. La soluzione in ogni replica è stata scambiata una volta ogni 5 gg per mantenere la concentrazione dei PFAS ad un livello costante e per evitare la crescita microbica nella soluzione nutritiva. Nel sesto esperimento piante precedentemente incubate per 72 h in una soluzione nutritiva contenente 1.0 mg/L di PFOS o 1.0 mg/L di PFOA, sono state rimosse dalla soluzione con il contaminante, sciacquate e trasportate in una soluzione priva di PFAS. Le piante e la soluzione idroponica sono state campionate a intervalli di tempo crescenti (0, 2, 4, 8 e 16 gg), sciacquate, asciugate e divise in radici e germogli. Successivamente nelle radici, nei suoi componenti subcellulari, nei germogli e nella soluzione idroponica sono stati estratti e determinati PFOS e PFOA con lo scopo di studiarne la dissipazione nelle radici. La soluzione in ogni replica è stata scambiata ad ogni intervallo di campionamento (gg 2, 4, 8 e 16).

2.2.3. Estrazione, determinazione e analisi mediante TEM

I tessuti vegetali freschi sono stati omogeneizzati tramite mortaio e pestello in una soluzione tampone di estrazione preraffreddata. L'omogeneizzato è stato poi trasferito in una provetta da 50 mL e sottoposto a due centrifugazioni a 4°C: la prima a 300 g per 30 s per ottenere la parete cellulare dal precipitato, poi il surnatante è stato centrifugato a 20.000 g per 45 minuti per far sedimentare gli organelli (tranne il vacuolo) e infine il surnatante restante rappresenta la frazione solubile in acqua (compreso il vacuolo). I PFAS nella frazione solubile subcellulare sono stati miscelati con metanolo puro (v/v = 50:50) contenente standard interni e successivamente determinati direttamente. I PFAS presenti nei campioni d'acqua sono stati estratti tramite estrazione in fase solida mentre i PFAS nei campioni vegetali sono stati estratti tramite metodiche già utilizzate in studi simili.

PFOA e PFOS poi sono stati analizzati dagli estratti tramite un sistema HPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Per l'analisi al TEM-EDS come gruppo di trattamento sono state utilizzate le piante coltivate per 72 h nella soluzione addizionata di PFAS (1,0 mg/L PFOS o 1,0 mg/L PFOA) mentre come bianco sono state utilizzate le piante coltivate per 72 h nella soluzione priva di PFAS. Le sezioni di radice fresca nella zona del pelo della radice sono state tagliate in pezzi da 2 mm, fissate, disidratate e tagliate in sezioni tramite ultramicrotomo. Le sezioni (50-100 nm) sono state montate su griglie di rame, colorate e osservate al microscopio elettronico a trasmissione. Lo spettro energetico del fluoro nelle varie sezioni è stato determinato utilizzando uno spettrometro a raggi X a dispersione di energia scansionando prima la superficie della fetta della radice per determinare se fosse presente fluoro (F). PFOS o PFOA nelle sezioni trasversali della radice sono stati identificati dall'esistenza dello spettro energetico di F, che non è stato osservato nel bianco.

2.2.4. Analisi dei dati: calcolo della concentrazione e velocità di assorbimento

L'accumulo e il trasporto tempo-dipendenti sono stati valutati tramite un'equazione che segue una cinetica di primo ordine:

$$C_t = C_0 + \alpha/k_e(1 - e^{-k_e t}) \quad (3)$$

dove C_t è la [PFOS] o [PFOA] (mg/kg) nelle radici e germogli al tempo t (h); k_e la costante di velocità di escrezione; α la costante del flusso di assorbimento e C la concentrazione esterna biodisponibile in soluzione (mg/L). Supponendo che la [PFOS] o [PFOA] all'inizio dell'esperimento (C_0) sia un pool di grandezza costante, l'equazione (1) è stata utilizzata per calcolare la [PFOS] o [PFOA] allo stato stazionario (C_{ss}) in radici e germogli, tale concentrazione poi è stata utilizzata per calcolare il BAF e TF. L'assorbimento concentrazione-dipendente di PFOS e PFOA è stato descritto invece con un'equazione di Michaelis-Menten:

$$V = V_{max}C/(K_m + C) \quad (4)$$

dove V è la velocità di assorbimento; C la [PFOS] o [PFOA] nella soluzione; K_m la costante di Michaelis ([substrato] per cui ho una velocità di assorbimento pari alla metà di V_{max}); infine V_{max} è la velocità massima di assorbimento quando tutti i siti di trasporto sono occupati.

3. RISULTATI

3.1. Utilizzo di *Juncus sarophorus* come potenziale pianta per il fitorisanamento di aree contaminate dai PFAS (Zhu et al., 2022)

3.1.1. Assorbimento dei PFAS da parte della pianta

Non è stato rivelato nessun PFAS nelle piante coltivate su suoli irrigati con acqua priva di PFAS (C0), ciò conferma che non sia avvenuta contaminazione di PFAS dai prodotti in plastica o dai reagenti chimici utilizzati nello studio. La massa in peso secco di PFHxS, PFOA e PFOS accumulata e incorporata in *J. Sarophorus*, dopo 190 gg di crescita in terreni irrigati con 10 o 100 µg/L di PFAS, è rispettivamente di 331 µg/kg e 3937 µg/kg, mentre la massa totale di PFAS all'interno del suolo è di 138 (C10) e 1200 µg/kg (C100). I dati ottenuti ci mostrano una relazione positiva lineare nel tempo tra le [PFOS], [PFOA] e [PFHxS] nelle radici e germogli e la concentrazione degli stessi composti nell'acqua di irrigazione, così come nel suolo. La linearità di tale relazione conferma che a questi livelli di concentrazione di PFAS non vi sono effetti fitotossici. Le [PFAS] nelle radici e nei germogli, inoltre, sono proporzionali al tempo di esposizione a tali sostanze e la velocità di assorbimento è addirittura triplicata negli ultimi tre mesi in confronto ai primi tre: da 0.9 µg/kg/gg (C10) e 11.8 µg/kg/gg (C100) a 2.6 µg/kg/gg (C10) e 29.6 µg/kg/gg (C100) rispettivamente. Questo perché inizialmente i PFAS devono prima essere assorbiti dal suolo e poi dalle piante e quindi la velocità di assorbimento da parte delle piante continuerà ad aumentare fino al raggiungimento di un equilibrio tra la [PFAS] nel suolo e le [PFAS] nell'acqua interstiziale, qui la velocità di assorbimento si stabilizzerà. Le [PFAS] nei germogli dipendono anche dalle caratteristiche fisico-chimiche delle molecole, in particolare aumentano con la diminuzione della lunghezza della catena di tali composti: le concentrazioni dopo sei mesi di irrigazione risultano [PFOS] (composto a 8C) = 280 ng/g, [PFHxS] (6C) = 1100 ng/g. Dopo un tempo di esposizione prolungato anche nelle radici possiamo notare lo stesso andamento, con [PFHxS] > [PFOA] > [PFOS]. Lo stesso ordine, quindi, vale anche per le velocità di (in C100: PFHxS 15.2 µg/kg/gg, PFOA 9.7 µg/kg/gg, PFOS 4.7 µg/kg/gg). Una possibile spiegazione a tale fenomeno può essere connessa alla biodisponibilità di tali composti in suoli insaturi e nella loro affinità con le particelle del suolo e con l'interfaccia aria-acqua. È stato infatti dimostrato che i PFAS a catena corta possono avere una maggiore biodisponibilità grazie loro ripartizione preferenziale nella fase acquosa del suolo, mentre i composti a catena più lunga possiedono una maggiore affinità di assorbimento per le particelle del suolo e l'interfaccia aria-acqua e come conseguenza, quindi, potrebbero non essere biodisponibili per l'assorbimento da parte delle piante.

È stato possibile calcolare i tassi di rimozione dei PFAS totali grazie alle masse di PFAS accumulate dalla pianta: il 3.1% (C10) e il 3.4% (C100) dei PFAS totali sono stati rimossi dopo 95 gg per poi aumentare al 9% (C10) e all'11% (C100) dopo sei mesi di esposizione. I tassi di rimozione più elevati sono stati documentati per PFHxS, seguito da PFOA e poi PFOS in tutti i periodi di tempo.

3.1.2. BAFs e TFs

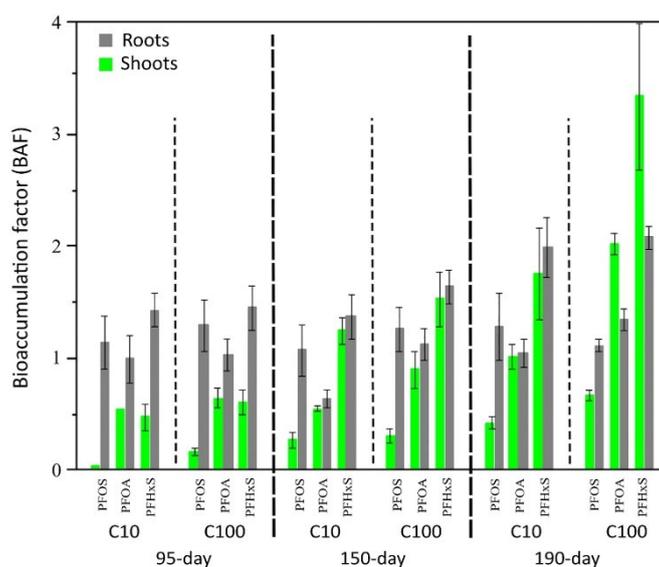


Fig. 1. BAF di PFOS, PFOA and PFHxS in *J. sarophorus* (Zhu et al., 2022)

I BAFs calcolati sui 190 gg nei germogli e nelle radici seguono l'ordine $BAF_{PFHxS} (0.47-3.34; 1.43-2.08) > BAF_{PFOA} (0.55-2.03; 0.66-1.34) > BAF_{PFOS} (0.03-0.67; 1.12-1.33)$ dove il primo valore indica il BAF nei germogli e il secondo il BAF nelle radici (Fig. 1). Ciò conferma quanto detto riguardo all'assorbimento preferenziale dei PFAS a catena corta. I dati ottenuti non mostrano una correlazione diretta tra i BAF delle radici e la temperatura giornaliera, né con l'umidità atmosferica e né con il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua nel suolo. Inoltre i BAF delle radici risultano inversamente proporzionali alla lunghezza della catena C-F e al peso molecolare dei composti.

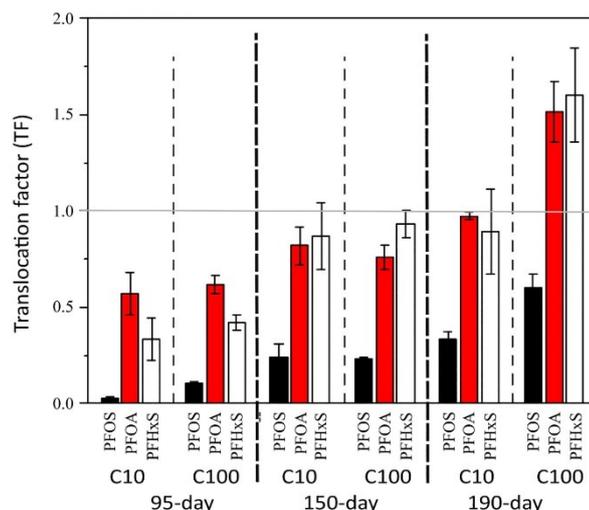


Fig. 2. TF of PFOS, PFOA and PFHxS in *J. sarophorus* (Zhu et al., 2022)

I valori di TF ottenuti sono aumentati con l'aumentare del tempo di esposizione per tutti i PFAS e, in particolare, il TF_{PFOS} è risultato il più basso (Fig. 2) confermando quanto detto sul trasporto dei PFAS a catena lunga verso i germogli. È stata rilevata anche una correlazione positiva tra il TF e il tasso di irrigazione giornaliero medio, così come con la temperatura giornaliera media; mentre si ha una correlazione negativa tra TF e peso molecolare, lunghezza della catena C-F e umidità della serra. Temperatura e umidità influiscono sulla stato di apertura/chiusura degli stomi e quindi i risultati ottenuti suggeriscono che i PFAS assorbiti dalle radici delle piante vengano trasportati al germoglio dal flusso di traspirazione.

3.2. Studio del meccanismo e processo di assorbimento e della distribuzione subcellulare dei PFAS nella pianta *Alisma Orientale* al fine di valutarne il potenziale di fitorisanamento (Wang et al., 2020)

3.2.1. Assorbimento dei PFAS da parte della pianta

Le [PFOS] e [PFOA] nelle radici delle piante sono aumentate linearmente dalle 0 alle 12 h e successivamente dalle 12 alle 48 h sono aumentate lentamente fino a raggiungere saturazione alle 120 h. PFOS possiede un α più alto e un k_e più basso nelle radici e ciò comporta un $BAF_{PFOS} > BAF_{PFOA}$. Nei germogli, invece, abbiamo una situazione opposta, l' α e k_e del PFOA sono rispettivamente 1.6 e 4.6 volte superiori a quelli del PFOS. TF è stato calcolato dal rapporto tra la C_{ss} della radice e la C_{ss} del germoglio ottenendo così un TF per PFOA maggiore di 1.15 volte rispetto a quello del PFOS. Sulla base dell'equazione (3) l'accumulo di PFOS e PFOA nelle radici è il risultato dell'assorbimento e dell'escrezione dei PFAS nelle radici. La velocità di assorbimento dalle 0 alle 12 h è stabile ed elevata, dovuto all'elevato assorbimento e all'escrezione trascurabile di PFOS e PFOA nelle radici delle piante. Pertanto, l'accumulo di PFOS e PFOA nelle radici è unicamente il risultato

dell'assorbimento delle radici. Successivamente poiché l'escrezione dei PFAS aumenta dalle 12 alle 48 h i tassi di accumulo diminuiscono fino ad avvicinarsi allo 0 dalle 48 alle 120 h a causa dell'equilibrio tra assorbimento ed escrezione nella radice.

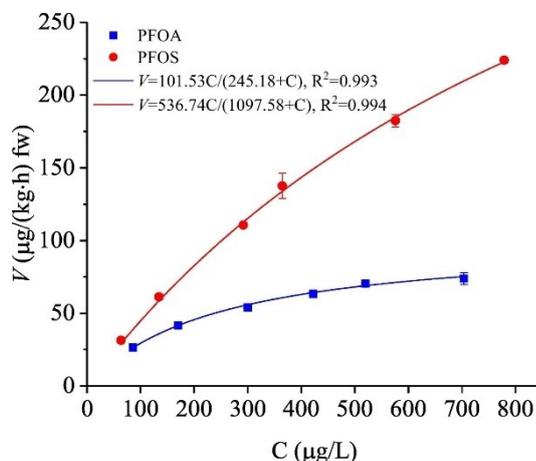


Fig. 3. Assorbimento concentrazione-dipendente di PFOS e PFOA da parte delle radici delle piante (Wang et al., 2020)

L'assorbimento di PFOS e PFOA dipendente dalla concentrazione da parte delle radici non è lineare con $V_{max} = 101,5 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ e $K_m = 245,2 \mu\text{g}/\text{L}$ per PFOS mentre con $V_{max} = 536,7 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ e $K_m = 1097,6 \mu\text{g}/\text{L}$ per PFOA (Fig. 3). L'assorbimento concentrazione-dipendente di PFOS e PFOA da parte delle radici di *A. orientale* ha quindi seguito bene il modello di Michaelis-Menten (4) indicando che l'assorbimento di PFOS e PFOA è mediato da trasportatori. L'assorbimento di PFOS e PFOA è stato ridotto rispettivamente del 14,4% e del 24,1% quando le piante sono state trattate con l'inibitore metabolico 2,4-DNP. Questo suggerisce una dipendenza energetica dell'assorbimento di questi composti. L'assorbimento di PFOS e PFOA è diminuito del 30,9-33,9% e del 22,3-25,3% se trattati rispettivamente con glicerolo e AgNO_3 ; possiamo dedurre quindi che l'acquaporina sia uno dei canali utilizzati da PFOS e PFOA per il loro assorbimento nella pianta. L'inibitore del canale anionico 9-AC ha diminuito l'assorbimento di PFOS dell'11,1% e il DIDS ha inibito l'assorbimento di PFOA del 16,4%. L'inibitore NPPB ha diminuito l'assorbimento di PFOS e PFOA rispettivamente del 27,6% e del 23,9%. Ciò ci indica che l'assorbimento di queste due molecole sia mediato anche da canali anionici. La presenza di PFOS ha inibito l'assorbimento di PFOA nelle radici di *A. orientale* del 31,0% e la presenza di PFOA ha inibito l'assorbimento di PFOS del 14,7%; si è pertanto verificata un'inibizione competitiva quando PFOS e PFOA sono presenti nella soluzione di coltura. Possiamo quindi dedurre che l'assorbimento di queste due sostanze potrebbe condividere un meccanismo di trasporto simile.

3.2.2. Distribuzione subcellulare dei PFAS nelle radici delle piante

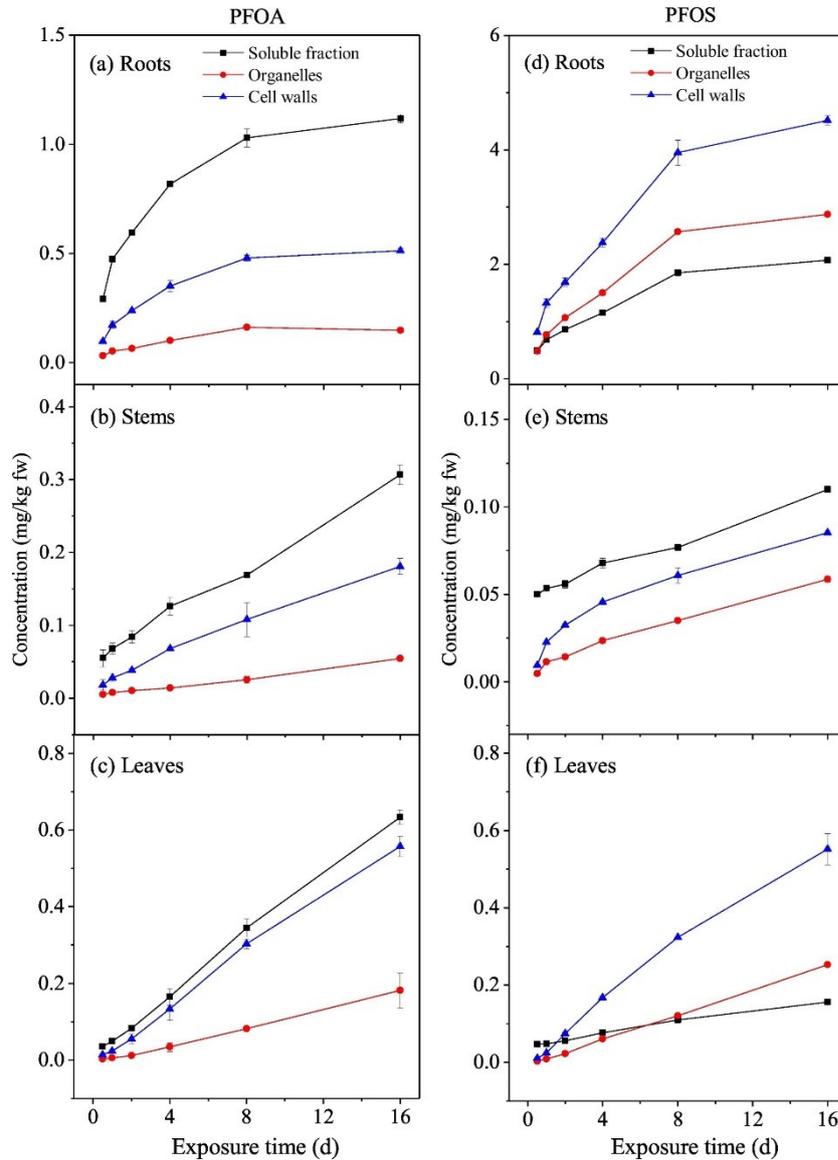


Fig. 4. Concentrazioni di PFOS e PFOA nei componenti subcellulari di radici, steli e foglie a diversi tempi di esposizione (Wang et al., 2020)

Le [PFOS] e [PFOA] negli steli, nelle foglie e nei loro componenti subcellulari sono aumentati linearmente con l'aumento del tempo di esposizione da 0.5 a 16 gg mentre nelle radici e nei suoi componenti subcellulari abbiamo un aumento della concentrazione più lento. Le [PFOS] e [PFOA] nelle piante (dai 2 ai 16 gg) decrescono nel seguente ordine: radici (0.90–9.47 mg/kg) > foglie (0.15–1.37 mg/kg) > stelo (0.10–0.54 mg/kg). Questo mi indica che PFOS e PFOA si accumulano più nelle foglie che negli steli. La frazione solubile possiede la [PFOA] più alta nelle radici, steli e foglie, si tratta di valori che sono 1.1-3.0 e 3.5-12 volte più alti dei valori nelle pareti cellulari e negli organelli rispettivamente. Le pareti cellulari presentano la [PFOS] più alta in radici e foglie con valori che risultano essere 1.5-3.3 e 1.5-3.5 volte i valori di concentrazione ottenuti negli organelli

cellulari e nella frazione solubile. Mentre negli steli la [PFOS] risulta più alta nella frazione solubile (1.9-10.4 e 1.3-5.2 volte quella negli organelli e pareti rispettivamente).

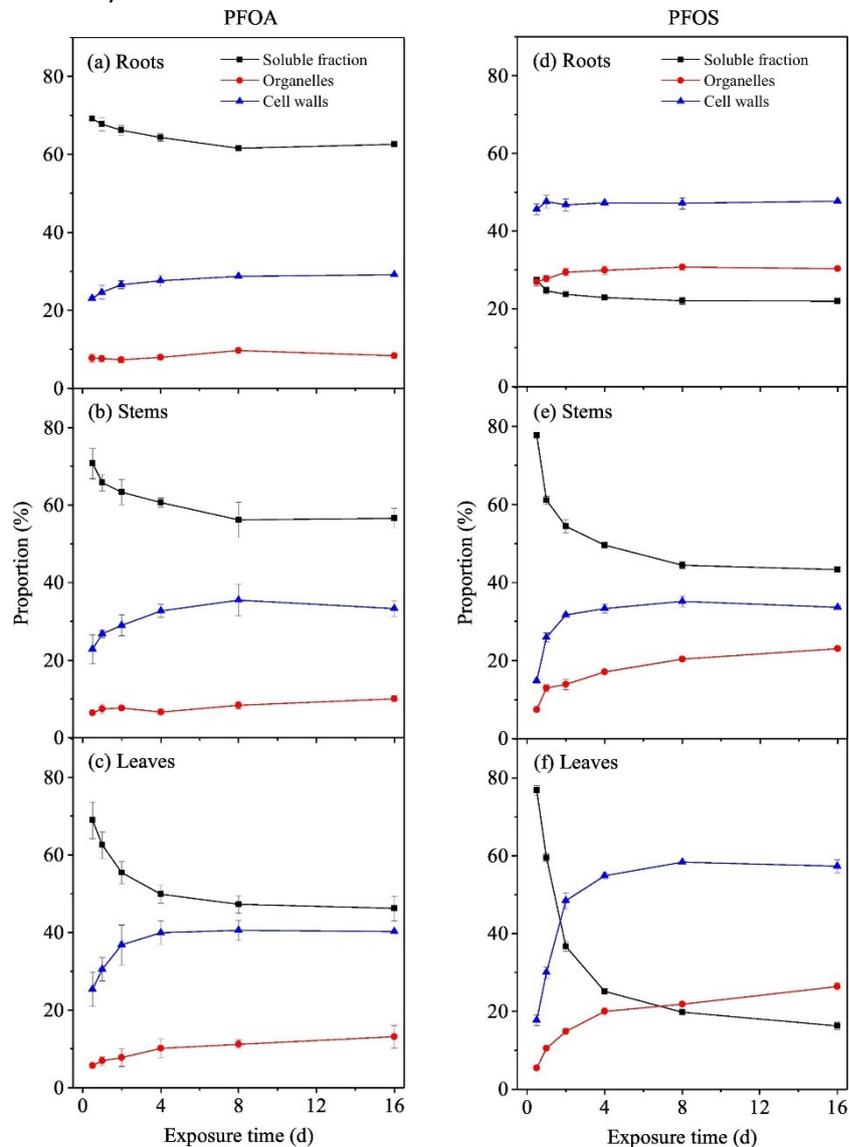


Fig. 5. Proporzioni di PFOS e PFOA nelle componenti subcellulari di radici, fusti e foglie a differenti tempi di esposizione (Wang et al., 2020)

Dai 0.5 agli 8 gg, con l'aumento del tempo di esposizione, le proporzioni di PFOA e PFOS nella frazione solubile di radici, steli e foglie sono diminuite dal 69.0-70.8% al 47.2-61.6% e dal 27.4-77.7% al 19.8-44.5%, rispettivamente (Fig. 5). Nello stesso periodo, PFOA e PFOS nelle pareti cellulari sono aumentati rispettivamente dal 22.0-25.3% al 28.7-40.6% e dal 14.8-45.6% al 35.2-58.4% mentre negli organelli sono aumentati rispettivamente dal 5.7-7.7% al 9.7-13.2% e dal 5.5-27.0% al 20.3-30.7% (Fig. 5). Dopo 8 giorni di esposizione, la distribuzione di PFOA e PFOS nei componenti subcellulari si è avvicinata a uno stato relativamente stabile (Fig. 5). La diminuzione di PFOS e PFOA nella frazione solubile corrispondeva in gran parte all'aumento di PFOS e PFOA nelle pareti cellulari e negli organelli; ciò suggerisce

che PFOS e PFOA si accumulino prima nella frazione idrosolubile e poi vengano gradualmente assorbiti dalle pareti cellulari e che una certa proporzione assorbita nella parete cellulare possa passare attraverso la parete cellulare e il plasmalemma e legarsi con gli organelli. Il PFOA nella frazione solubile (46.2-70.7%) è significativamente maggiore rispetto a quello delle pareti cellulari (22.8-40.6%) e degli organelli (5.7-13.2%). Ciò indica che la frazione solubile è il principale componente di stoccaggio del PFOA. Lo stesso è applicabile anche al PFOS negli steli; nelle radici e nelle foglie invece (dai 2 ai 16 gg) la proporzione di PFOS è maggiore nelle pareti cellulari (45.6-58.4%) che negli organelli (14.8-30.7%) e nella frazione solubile (16.3-36.7%). Ciò indica che nelle radici e nelle foglie, il PFOS si distribuisce principalmente nella parete cellulare, mentre negli steli si distribuisce principalmente nella frazione solubile (Fig 5).

3.2.3. La dissipazione dei PFAS nelle radici delle piante

Le [PFOA] e [PFOS] nelle radici sono diminuite rispettivamente da 0,59 a 0,11 mg/kg e da 2,19 a 0,44 mg/kg dopo 16 gg dal trasferimento delle piante in soluzioni prive di PFOA e PFOS. Di conseguenza, le [PFOA] e [PFOS] nella soluzione idroponica sono aumentate da 0,00 a 2,94 e da 0,00 a 10,64 µg/L rispettivamente. Le [PFOA] e [PFOS] nei germogli delle piante sono aumentate da 0,07 a 0,09 mg/kg e da 0,05 a 0,06 mg/kg, rispettivamente, dai 0 ai 4 gg. Ciò indica che la diminuzione delle [PFOA] e [PFOS] radicali è correlata alla traslocazione verso l'alto di PFOA e PFOS verso i germogli (dai 0 ai 4 gg) e al loro efflusso nella soluzione idroponica. Dai 4 ai 16 gg, le [PFOA] e [PFOS] nei germogli sono diminuite gradualmente da 0,09 a 0,07 mg/kg e da 0,06 a 0,04 mg/kg (Fig. 6a e d), rispettivamente, suggerendo che il PFOA e il PFOS accumulato nei germogli potrebbe essere trasportato verso il basso nella soluzione idroponica. Tramite i calcoli del bilancio della distribuzione di massa di PFOA e PFOS si è determinato il contributo della traslocazione verso l'alto (5.0-16.1% e 1.9-3.0%) e dell'efflusso nella soluzione (72.9-89.4% e 82.7-85.7%) alla dissipazione di PFOS e PFOA nelle radici. Per accertarsi del fenomeno dell'efflusso di PFOS e PFOA nelle radici, è stata determinata la [PFOS] e [PFOA] nei componenti subcellulari notando la loro diminuzione graduale dai 0 ai 16 gg

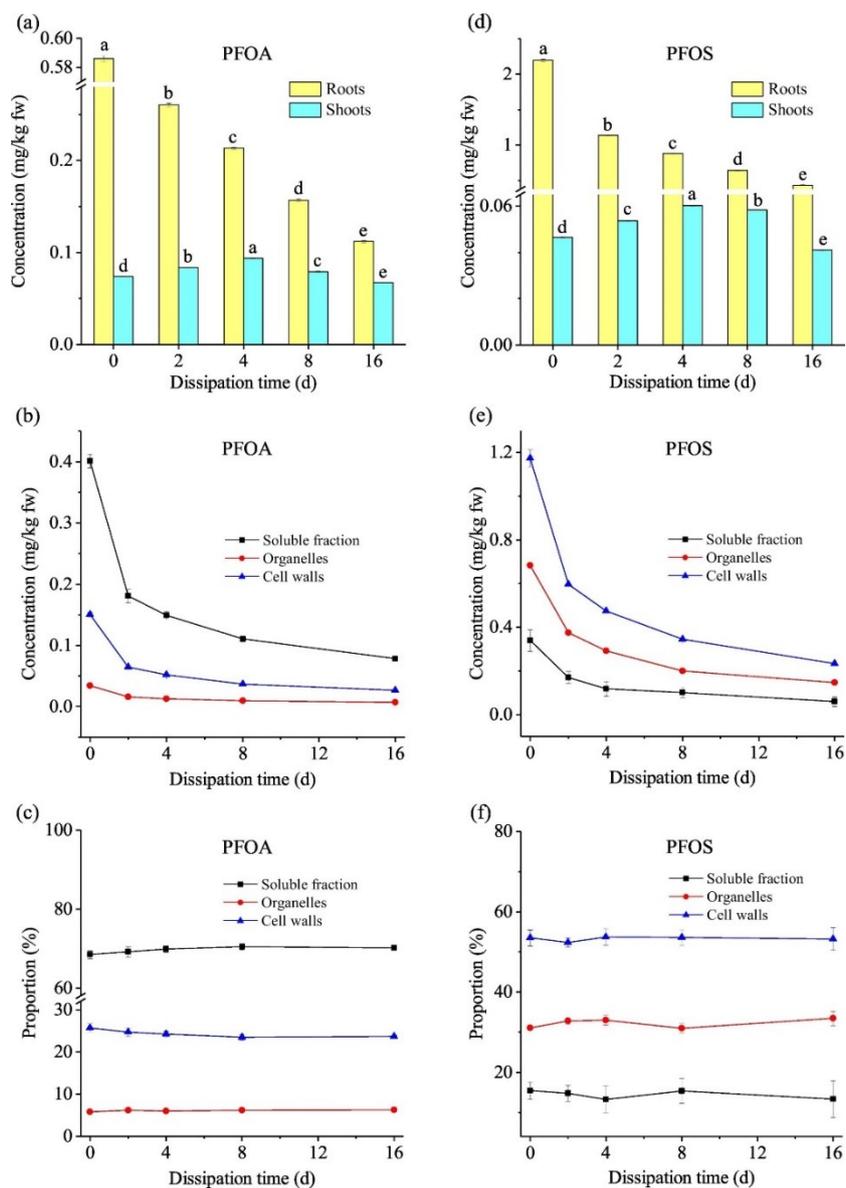


Fig. 6. [PFOS] e [PFOA] nei tessuti vegetali (a, d) e nelle frazioni subcellulari delle radici (b, e) in differenti tempi di dissipazione. Proporzioni di PFOS e PFOA nelle frazioni subcellulari delle radici in funzione del tempo di dissipazione (c, f) (Wang et al., 2020)

3.2.4. Visualizzazione della distribuzione a livello cellulare

Dall'analisi al TEM-EDS si è rivelata la presenza di PFOS e PFOA nelle pareti cellulari, negli spazi intercellulari e in vari organelli (ad es. nucleo cellulare, mitocondri, cloroplasto e citoplasma). Ciò ha suggerito che tali sostanze presenti nella soluzione extracellulari potrebbe legarsi alle pareti cellulari e che una parte potrebbe passare attraverso la parete e il plasmalemma e legarsi con gli organelli. Nella corteccia e nel fascio vascolare di *A. orientale*, PFOS e PFOA sono stati trovati sia nello spazio apoplastico che nello spazio simplastico.

4. DISCUSSIONE

Il fitorisanamento è una strategia di risanamento nuova, economica, efficiente, ecologica, applicabile *in situ* e basata sull'energia solare. Si tratta di una tecnica già largamente utilizzata e studiata per il risanamento di aree contaminate da metalli pesanti (Ali et al., 2013) e, visto il suo successo, si è cercato di traslare le sue potenzialità nella bonifica di aree contaminate dalle sostanze perfluoroalchiliche e polifluoroalchiliche (PFAS).

Visto la numerosità dei fattori coinvolti nella determinazione del potenziale di fitorisanamento delle piante, siano essi fattori legati alle caratteristiche chimico-fisiche dei PFAS, della pianta o dell'ambiente, e vista la complessità delle interazioni di questi fattori, risulta necessario approfondire come queste molecole vengono assorbite e trasferite nelle piante e come vengono distribuite all'interno delle cellule vegetali. A tal proposito, in uno studio qui presentato è stato esplorato il meccanismo e il processo di assorbimento di PFOS e PFOA nella pianta *Alisma orientale* tramite una serie di esperimenti che hanno mostrato come il meccanismo di assorbimento di PFOS e PFOA sia un processo che richiede energia e che prevede l'utilizzo di trasportatori, in particolare delle acquaporine e dei canali anionici. È stato inoltre dimostrato come il processo di assorbimento segua sia la via apoplastica che la via simplastica.

Un limite nell'applicabilità del fitorisanamento consiste nella carenza di studi in cui vengono riprodotte le condizioni di campo. La maggior parte degli studi presenti, infatti, si basano su esperimenti in idroponica, che non possono rappresentare in modo ottimale le potenzialità di fitorisanamento di tali piante direttamente *in situ* nelle aree contaminate. Per questo motivo è stato qui presentato uno dei pochi studi ad oggi effettuati che, in serra, mimano le condizioni di campo. In tale studio è stata utilizzata la pianta *Juncus sarophorus* che si è rivelata essere una possibile candidata per la fitoestrazione dei PFAS a catena corta. Tale pianta possiede infatti una ottima tolleranza e una buona capacità di accumulo di PFHxS e PFOA.

Data la complessità degli studi preliminari per l'applicazione della tecnica di fitorisanamento in aree contaminate da PFAS risulta necessario un approccio multidisciplinare che preveda un lavoro cooperativo di biotecnologi, botanici, fisiologi, agronomi, biochimici e ambientalisti.

BIBLIOGRAFIA

1. **Evangelou**, Michael W. H., and Brett H. Robinson. 'The Phytomanagement of PFAS-Contaminated Land'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, no. 11 (2 June 2022): 6817. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116817>.
2. **Fenton**, Suzanne E., Alan Ducatman, Alan Boobis, Jamie C. DeWitt, Christopher Lau, Carla Ng, James S. Smith, and Stephen M. Roberts. 'Per- and Polyfluoroalkyl Substance Toxicity and Human Health Review: Current State of Knowledge and Strategies for Informing Future Research'. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40, no. 3 (March 2021): 606–30. <https://doi.org/10.1002/etc.4890>.
3. **Ghisi**, Rossella, Teofilo Vamerali, and Sergio Manzetti. 'Accumulation of Perfluorinated Alkyl Substances (PFAS) in Agricultural Plants: A Review'. *Environmental Research* 169 (1 February 2019): 326–41. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.023>.
4. **Mayakaduwege**, Sonia, Anusha Ekanayake, Sudarshan Kurwadkar, Anushka Upamali Rajapaksha, and Meththika Vithanage. 'Phytoremediation Prospects of Per- and Polyfluoroalkyl Substances: A Review'. *Environmental Research* 212, no. Pt B (September 2022): 113311. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113311>.
5. **Shahsavari**, Esmaeil, Duncan Rouch, Leadin S. Khudur, Duncan Thomas, Arturo Aburto-Medina, and Andrew S. Ball. 'Challenges and Current Status of the Biological Treatment of PFAS-Contaminated Soils'. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.602040>.
6. **Wang**, Tuan-Tuan, Guang-Guo Ying, Liang-Ying He, You-Sheng Liu, and Jian-Liang Zhao. 'Uptake Mechanism, Subcellular Distribution, and Uptake Process of Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonic Acid by Wetland Plant *Alisma Orientale*'. *Science of The Total Environment* 733 (1 September 2020): 139383. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139383>.
7. **Zhu**, Jiawen, Ilka Wallis, Huade Guan, Kirstin Ross, Harriet Whiley, and Howard Fallowfield. 'Juncus Sarophorus, a Native Australian Species, Tolerates and Accumulates PFOS, PFOA and PFHxS in a Glasshouse Experiment'. *Science of The Total Environment* 826 (20 June 2022): 154184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154184>.
8. **Ali**, Hazrat, Ezzat Khan, and Muhammad Anwar Sajad. 'Phytoremediation of Heavy Metals—Concepts and Applications'. *Chemosphere* 91, no. 7 (1 May 2013): 869–81. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.