

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

**Fytoremediace: biochemické charakteristiky rostlin
hyperakumulujících těžké kovy**



Bakalářská práce

Jana Lábusová
2010

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.
Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK

Konzultant bakalářské práce:

RNDr., Mgr. Petr Soudek, Ph.D.
Ústav experimentální botaniky AVČR, Laboratoř rostlinných biotechnologií

Poděkování

Děkuji své školitelce Doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za odbornou pomoc a velkou trpělivost. Rovněž bych chtěla poděkovat RNDr., Mgr. Petru Soudkovi, Ph.D. a RNDr. Petře Suchomelové, Ph.D. za věcné připomínky.

ABSTRAKT

Znečištění vod a půd těžkými kovy představuje velmi závažný problém dnešního světa. Od počátku průmyslové revoluce koncentrace těžkých kovů v životním prostředí prudce vzrostla. Jednou z možností, jak půdy dekontaminovat, je fytořemediace nebo-li odstranění škodlivých látek z kontaminovaných míst pomocí rostlin. Tato ekologicky přívětivá a relativně levná metoda využívá schopnosti rostlin přijímat, translokovat, transformovat a ukládat kovy. Při fytořemediaci se používají hlavně rostliny, které dokáží akumulovat kov ve vysokých koncentracích. Tyto rostliny byly pojmenovány "hyperakumulátory". Akumulace kovů rostlinou může být ovlivněna nejen schopnostmi dané rostliny, ale i formou a koncentrací kovu v daném prostředí, ve kterém se rostlina nachází.

Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky o vlivu těžkých kovů na biochemické změny v rostlinách se zvláštním důrazem na změny sacharidového metabolismu.

Klíčová slova:

Fytořemediace, těžké kovy, sacharidy, metabolismus, hyperakumulátor

ABSTRACT

Water and soil pollution by heavy metals is a very serious problem of nowadays. Since the beginning of industrial revolution, the concentration of heavy metals increased sharply in the environment. One way how to decontaminate soils and groundwaters is phytoremediation that uses plants to remediate pollutants from the contaminated sites. This eco-friendly and cost-effective method exploits the ability of plants to take up, translocate, transform and sequester metals. In phytoremediation, the plants that are able to accumulate metals to high concentration are mainly used. These plants are named “hyperaccumulators”. Accumulation of metals by plants is affected not only by the capability of plant in question, but to a great extend also by the form and concentration of metal in the soil and environmental conditions.

The aim of this Bachelor thesis is to summarize knowledge on impact of heavy metals on biochemical changes in plants, with special emphasis on changes in carbohydrate metabolism.

Keywords:

Phytoremediation, heavy metals, carbohydrates, metabolism, hyperaccumulators

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 6PGDH** (6-phosphogluconat dehydrogenase) 6-fosfoglukonátdehydrogenáza
- AI** (acid invertase) kyselá invertáza
- ALAD** (δ -aminolevulinic acid dehydratase) dehydratáza kyseliny 5-aminolevulové
- APX** (ascorbate peroxidases) askorbátperoxidáza
- ASC** (ascorbate) askorbát
- CAT** (catalase) kataláza
- DW** (dry weight) suchá hmotnost
- EDTA** (ethylenediaminetetraacetic acid) ethylendiamintetraoctová kyselina
- EPA** (Environmental Protection Agency)
- FK** (fructokinase) fruktokináza
- G6PDH** (glucose-6-phosphate dehydrogenase) glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
- GoIS** (galactinol synthase) galaktinolsyntáza
- GSH** (glutathione) glutathion
- HK** (hexokinase) hexokináza
- ITRC** (Interstate technology and Regulatory Cooperation)
- NI** (neutral invertase) neutrální invertáza
- NR** (nitrate reductase) nitrátreduktáza
- OFFRs** (oxidized fructan free radicals) oxidované fruktanové radikály
- PCs** (phytochelatins) fytochelatiny
- PPP** (pentose phosphate pathway) pentózafosfátový cyklus
- PSII** (photosystem II) fotosystém II
- RFOs** (raffinose family oligosaccharides) sacharidy rafinózové řady
- ROS** (reactive oxygen species) reaktivní kyslíkové radikály
- Rubisco** (ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)
ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza)
- SOD** (superoxide dismutase) superoxiddismutáza
- SPS** (sucrose phosphate synthase) sacharózafosfátsyntáza
- SS** (sucrose synthase) sacharózasyntáza

OBSAH

<i>ABSTRAKT</i>	3
<i>Klíčová slova:</i>	3
<i>ABSTRACT</i>	4
<i>Keywords:</i>	4
<i>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</i>	5
<i>OBSAH</i>	6
<i>1. ÚVOD</i>	7
<i>2. ROZDĚLENÍ FYTOREMEDIATIONNÍCH TECHNIK</i>	8
2.1 Fytoextrakce	9
2.2 Fytostabilizace	11
2.3 Fytovolatilizace	12
2.4 Rhizofiltrace	13
<i>3. HYPERAKUMULÁTORY</i>	14
<i>4. PŘÍJEM TĚŽKÝCH KOVŮ</i>	17
<i>5. VLIV TĚŽKÝCH KOVŮ NA METABOLISMUS ROSTLIN</i>	19
5.1. Vliv těžkých kovů na aktivitu enzymů	19
5.2. Antioxidační obrana	20
5.3. Vliv těžkých kovů na fotosyntézu	22
5.4. Vliv těžkých kovů na metabolismus sacharidů	23
5.4.1. Distribuce sacharidů v rostlině	23
5.4.1.1. Sacharóza	23
5.4.1.2. Škrob	24
5.4.1.3. Sacharidy rafinózové řady (RFOs)	24
5.4.1.4. Fruktany	25
5.4.2. Aktivita enzymů sacharidového metabolismu	26
<i>6. ZVÝŠENÍ ÚČINNOSTI FYTOREMEDIACE</i>	29
6.1. Syntetické chelátory	29
6.2. Půdní mikroorganismy	30
6.3. Hnojení	31
6.4. Transgenní rostliny	32
<i>7. ZÁVĚR</i>	33
<i>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</i>	34

1. ÚVOD

Fytoremediace je definována jako metoda využívající rostliny k odstranění škodlivých látek z prostředí nebo jejich transformaci (Cunningham *et al.*, 1996). Je to alternativní přístup k vyčištění životního prostředí jak od organických, tak i anorganických kontaminantů. Využívá tzv. přirozenou atenuaci, tedy souhrn dějů přirozeně se vyskytujících v životním prostředí, které bez lidského zásahu vedou k omezení množství toxicity, mobility nebo objemu kontaminantu. Přirozená atenuace je založená na přirozených metabolických procesech, které probíhají v rostlinných, popřípadě mikrobiálních buňkách a které se vyvíjely po miliony let (Soudek *et al.*, 2008).

Myšlenka využití rostlin k odstranění kovů z prostředí není nová, již staletí lidé používají rákosové porosty a mokřady k vyčištění odpadních vod. V moderním pojetí fytoremediace se využívají zejména rostliny, tzv. hyperakumulátory (viz kapitola hyperakumulátory), které jsou schopny akumulovat velké množství kovů. Koncept využití hyperakumulujících rostlin ve fytoremediaci rozvinul R.L.Chaney (1983). První experimentální studie byla provedena na poli v Rothamsted Experimental Station (McGrath and Dunham, 2000).

Těžké kovy jsou definovány jako kovy, jejichž hustota je vyšší než 5 g.cm^{-3} (Schutzendubel and Polle, 2002). Pojem těžké kovy není zcela ustálený, poněvadž běžné hmotnostní kritérium neplatí pro lehké kovy jako je například hliník nebo selen, proto se může používat i termín "toxické" kovy. Ve své práci zůstanu u termínu těžké kovy. Kovy jsou přirozenou součástí zemské kůry. Vyskytují se v různých formách jako volné ionty, rozpustné půdní komplexy, organicky vázané kovy a nerozpustné sloučeniny. Jejich forma pak ovlivňuje mobilitu, biodegradaci a akumulaci v prostředí. Akumulaci kovů v půdě ovlivňuje zejména pH půdy, kdy jsou kovy při nižším pH více pohyblivé v půdním roztoku. Hlavními příčinami zvýšení akumulace těžkých kovů v ekosystému je lidská aktivita. Zdrojem emisí je především spalování fosilních paliv, výroba a zpracování železa, metalurgie neželezných kovů, spalovny odpadu, výroba cementu a skla, elektrolytická výroba chlóru, spalování olovnatého benzínu a také používání některých hnojiv (Schutzendubel and Polle, 2002).

2. ROZDĚLENÍ FYTOREMEDIAČNÍCH TECHNIK

Existuje více způsobů, jak odstranit kontaminující kovy z životního prostředí. Jelikož kovy se narozdíl od organických polutantů nedají degradovat, tak jejich remediace půdy kontaminované kovy je velmi složitá a drahá (Chaney *et al.*, 1997). Při odstranění kovů z půdy se využívají hlavně tyto strategie:

1. Fytoextrakce, kdy se kov akumuluje v nadzemní části rostliny, která je posléze sklizena.
2. Fytovolatilizace, kdy dojde k transpiraci těkavé formy kovu.
3. Fytostabilizace, kde je využíváno rostlin k imobilizaci vodní i půdní kontaminace kovu.
4. Rhizofiltrace, kde dochází k odstranění kovu z vody a jeho akumulace v kořenech vodních rostlin.

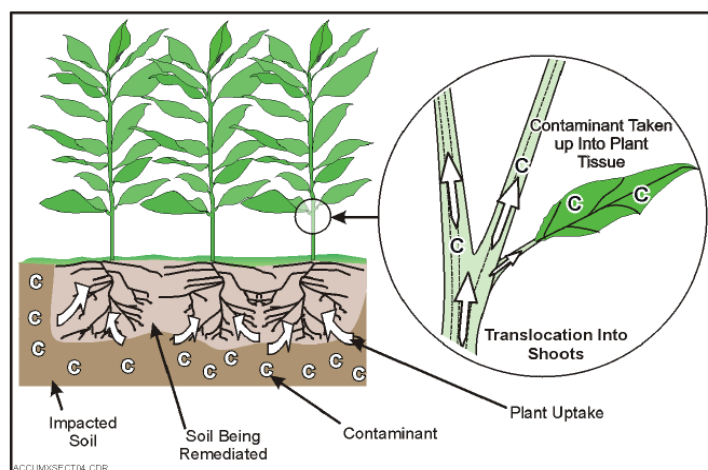
Mechanismus	Médium	Kontaminanty	Rostliny
Fytoextrakce	půda a sedimenty	Pb, Cd, Ni, Zn, Cu, Cr, Co, Hg, radionuklidy	brukev sítinovitá (<i>Brassica juncea</i>), slunečnice roční (<i>Helianthus annuus</i>)
Fytostabilizace	půda a sedimenty	As, Cd, Cu, Cr, Pb, Zn	lipnicovité (<i>Graminaceae</i>), topoly (<i>Populus spp.</i>)
Fytovolatilizace	půda, sedimenty, podzemní voda	Se, As, Hg	brukvovité (<i>Brassicaceae</i>), slunečnice roční (<i>Helianthus annuus</i>), mokřadní rostliny
Rhizofiltrace	podzemní a povrchová voda	Pb, Cd, Zn, Ni, Cu, radionuklidy	brukev sítinovitá (<i>Brassica juncea</i>), slunečnice roční (<i>Helianthus annuus</i>), vodní rostliny

Tab. 1: Rozdělení fytořremediačních technik.

2.1 Fytoextrakce

Fytoextrakce je založena na absorpci kovu kořeny s následnou akumulací v nadzemní části rostliny. Poté následuje sklizeň rostlin. Existují dvě strategie fytoextrakce, indukovaná a přirozená. U přirozené fytoextrakce dochází ke kontinuální akumulaci kovu v rostlině. Rostlina je schopna přirozeně přijmout kov svými kořeny s následnou akumulací. Rostlina musí být také schopna tolerovat jeho vysokou koncentraci. Při indukované fytoextrakci je do půdy přidáno aditivum, které zvýší rozpustnost nebo mobilitu kovu, takže ho rostliny mohou přijímat snadněji. Pro zvýšení účinku fytoextrakce se většinou do půdy přidávají syntetické chelátory, např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Salt *et al.*, 1998).

Pro úspěch fytoextrakce je zapotřebí, aby rostlina měla rychlý přírůstek biomasy a dokázala akumulovat velké množství kovu v nadzemních orgánech. Proto se při této metodě velmi dobře uplatňují hyperakumulující rostliny. Hyperakumulátory, které nacházejí uplatnění při polních pokusech pocházejí nejčastěji z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), hvězdnicovitých (*Asteraceae*), zimozrácovitých (*Buxaceae*) (EPA, 2000). Využití hyperakumulátorů v remediaci je limitováno jejich povětšinou malou produkcí biomasy a pomalým růstem. Proto je snaha o přenos "hyperakumulujících" vlastností do zemědělsky využívaných rostlin, například brukve sítinovité (b. hořčičná) (*Brassica juncea*) nebo kukuřice seté (*Zea mays*), které se snadno pěstují a mají vysoký přírůstek biomasy (Cunningham *et al.*, 1996).



Obr. 1: Fytoextrakce. Převzato z ITRC (2001).

Metoda fytoextrakce se uplatňuje nejen při odstraňování těžkých kovů, ale i radionuklidů (př. $^{238,234}\text{U}$, ^{137}Cs , ^{90}Sr). Je třeba dobře uvážit, co udělat dále se sklizenými rostlinami. Nejčastěji se sklizené rostliny spalují, přičemž vznikne jen malé množství popela, který se pak kontrolovaným způsobem ukládá. Spalování musí probíhat za přísných podmínek, aby se

škodliviny nedostaly zpět do prostředí. Dnes je velmi populární myšlenka využití rostlin při získávání kovů zejména vzácných prvků. Této metodě se říká fyto-mining (fytodobývání) (Cunningham *et al.*, 1996).

Aby fytoextrakce mohla být označena za účinný způsob dekontaminace, muselo by se odstranit 200 – 1000 kg kovu z 1 ha kontaminované půdy za rok v 20-tileté periodě (Cunningham *et al.*, 1996). Pro zjištění účinnosti fytoextrakce byl určen tzv. fytoextrakční koeficient, je to poměr množství kovu v rostlině (g kovu/g suchá hmotnost rostlin (DW)) ku množství kovu v půdě (g kovu/g DW půda). Ukazuje nám třeba, že příjem olova je mnohem těžší než příjem kadmia (viz Tab. 2) (EPA, 2000). Finanční náklady fytoextrakce jsou velice variabilní, záleží na typu kovu, půdních vlastnostech a množství materiálu, který je odstraňován (Cunningham *et al.*, 1996). Salt *et al.* (1998) odhadují, že fytoextrakce 1 akru půdy do hloubky 50 cm by stála \$60,000-100,000, ve srovnání odvoz půdy z kontaminované plochy stojí \$400,000.

Kov	Fytoextrakční koeficient (Rf)
Cr ⁶⁺	58
Cd ²⁺	52
Ni ²⁺	31
Cu ²⁺	7
Pb ²⁺	1,7
Cr ³⁺	0,1
Zn ³⁺	17

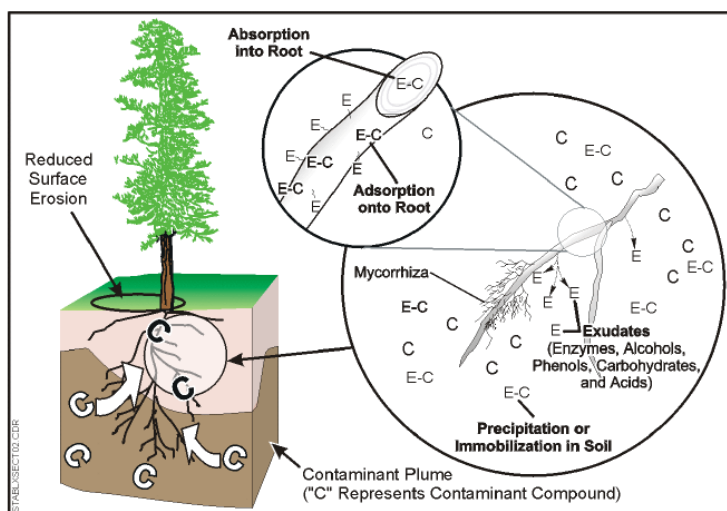
Tab. 2: Hodnoty fytoextrakčního koeficientu. Upraveno podle EPA (2000).

2.2 Fytostabilizace

Fytostabilizace je způsob využívající určité rostlinné druhy k imobilizaci kovů v půdě a vodě. Kov tedy nadále zůstává v půdě, ale jeho škodlivý vliv na prostředí je redukován. Fytostabilizace hodně závisí na chemických, biologických a fyzikálních vlastnostech půdy. Rostliny díky absorpci, adsorpci kořenů a precipitaci omezují migraci kovů v půdě a snižují jejich vymývání z půdy. Využívají zde mechanismu redoxních reakcí (např. Cr^{VI} na Cr^{III}) nebo precipitace na nerozpustnou formu (např. Pb je převedeno na fosfát). Rostlinné kořeny mohou vylučovat látky, exudáty, které ovlivňují pH půdy a vyvázání (sekvestraci) kovu. Rostliny také zabraňují vodní a větrné erozi vedoucí k rozšíření kontaminace (Cunningham *et al.*, 1996).

Obecně lze říci, že rostliny využívané ve fytostabilizaci by měly být vysoce tolerantní k vysokým hladinám kovu v prostředí. Avšak akumulace kovů v jejich pletivech je zde nevýhodou (Cunningham *et al.*, 1996). Uplatnění zde nacházejí trávy, které mají svazčité kořeny vhodné pro kontrolu eroze. Příkladem může být kostřava červená (*Festuca rubra*) nebo psineček tenký (*Agrostis tenuis*). Dále se využívají hojně topoly (*Populus spp.*) díky jejich vysoké toleranci ke kovům (EPA, 2000).

Fytostabilizace je vhodná metoda pro dekontaminaci velké plochy s relativně imobilními kovy. Lepší výsledky jsou u půd s hrubší texturou a vyšším obsahem organického materiálu. Je to velmi levná a šetrná metoda remediace. Využívá se zejména k finální úpravě ploch, kde byly k odstranění znečištění nejprve použity jiné sanační metody (Cunningham *et al.*, 1996).



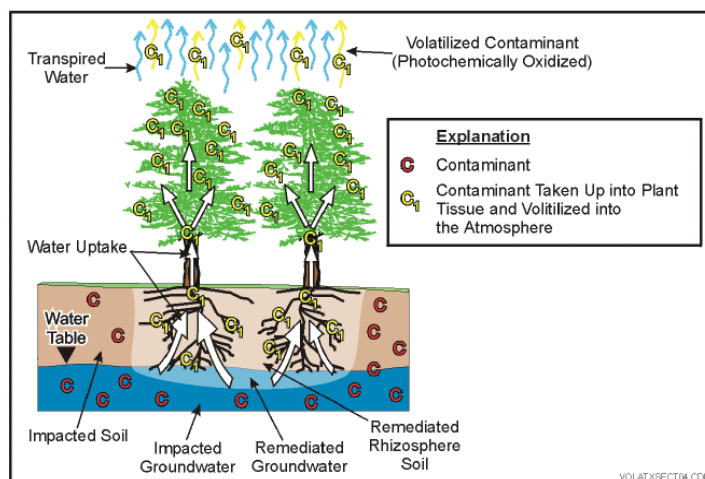
Obr. 2: Fytostabilizace. Převzato z ITRC (2001).

2.3 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je metoda založená na schopnosti některých rostlin přeměnit kov do těkavé formy, která může být méně nebo i více toxická. Tyto těkavé formy kovu následně rostliny v procesu transpirace uvolní do atmosféry. Takto může být odstraněn arsen, rtuť nebo selen, které existují právě i jako těkavé hydridy nebo methyl deriváty. Zatím není mnoho známo o tom, jak rostliny přeměňují kovy na těkavou formu, ale velmi pravděpodobně zde hrají nezastupitelnou roli bakterie a houby asociované s kořeny rostlin (Salt *et al.*, 1998).

Fytovolatilizace se nejvíce užívá k odstranění selenu. Zajímavým faktem je, že rostliny hyperakumulující selen, například kozinec (*Astragalus racemosus*), volatilizují selen ve formě dimethyldiselenidu. Naproti tomu tolíce vojtěška (*Medicago sativa*), zástupce rostlin nehyperakumulujících selen, produkuje dimethylselenid. Dalšími rostlinami, které dokáží volatilizovat selen, je brukev sítinovitá (b. hořčičná) (*Brassica juncea*) a brukev řepka olejka (*Brassica napus*) (Zayed *et al.*, 2000). Rostlinu, která dokáže akumulovat rtuť a následně ji přeměnit na elementární formu (Hg^0), zatím neznáme. Proto je velká snaha transformovat huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) bakteriálním genem pro *merA* reduktázu. Reduktáza *merA* dokáže přeměnit Hg^{2+} na méně toxickou formu Hg^0 (Rugh *et al.*, 1996).

Při fytovolatilizaci se nemusí rostlinný materiál sklízet a není potřeba rostlin s velkou biomasou. Další výhodou je minimální narušení ekosystému kontaminované plochy. Použití je nicméně kontroverzní, protože nedochází k odstranění kontaminace, ale pouze k přesunu kontaminace z půdy do ovzduší (Salt *et al.*, 1998).



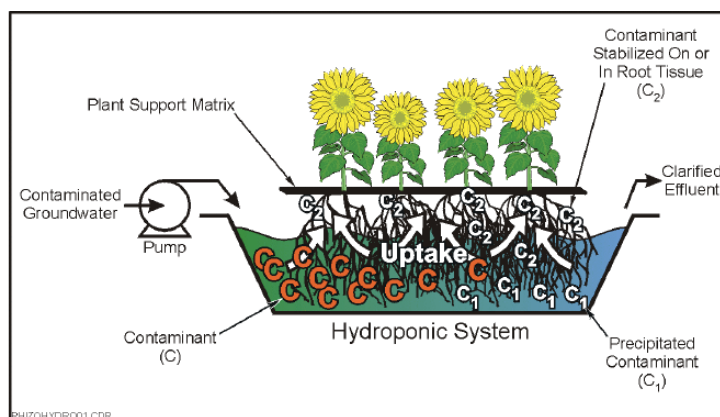
Obr. 3: Fytovolatilizace. Převzato z ITRC (2001).

2.4 Rhizofiltrace

Rhizofiltrace využívá adsorpci a absorpci kořenového systému k vyčištění povrchových i podzemních znečištěných vod. Narozdíl od fytoextrakce jsou cílovou částí akumulace kontaminantu kořeny. Metoda je zejména vhodná k odstranění nízkých koncentrací kovů z velkých objemů vody. S úspěchem se využívá i k odstranění radionuklidů.

Ideální rostliny pro rhizofiltraci by měly mít rozsáhlý kořenový systém a měly by být schopné akumulovat kov především v kořenech. Jako nejúčinnější rostliny pro rhizofiltraci se ukázaly být slunečnice roční (*Helianthus annuus*) a brukev sítinovitá (b. hořčičná) (*Brassica juncea*), pro svůj bohatý kořenový systém a vysokou rychlost růstu. Slunečnice efektivně odstraňuje Cd, Cr, Cu, Ni, Pb a Zn z vod, kdežto hořčice absorbuje Pb a U. Využití nacházejí i vodní rostliny, ale jejich nevýhodou je malý vzrůst. Uplatňuje se vodní hyacint (*Eichhornia crassipes*), okřehek menší (*Lemna minor*), stolítek klasnatý (*Myriophyllum spicatum*), či vodní kapradina azola americká (*Azolla filiculoides*) (Dushenkov *et al.*, 1995).

S úspěchem se tato metoda využívá k odstranění radioaktivních izotopů pomocí slunečnice roční v Černobyli. Rhizofiltrace se velmi dobře uplatňuje v konstrukci umělých mokřadů, kde se využívá schopnosti mokřadních rostlin např. rákosu obecného (*Phragmites australis*) či orobince (*Typha spp.*) k vyčištění zejména odpadních vod (EPA, 2000).



Obr. 4: Rhizofiltrace. Převzato z ITRC (2001).

3. HYPERAKUMULÁTORY

Všechny rostliny jsou schopné z půdy nebo vody přijímat a akumulovat ty těžké kovy, které jsou esenciální pro jejich růst a vývoj. Mezi tyto kovy patří železo, mangan, zinek, měď, hořčík, molybden, nikl, kobalt a selen. V rostlině mohou být součástí enzymů a pigmentů, zároveň ve vyšší koncentraci jsou již toxické. Některé rostliny však dokáží akumulovat i takové těžké kovy, u kterých nebyla prokázána žádná biologická funkce. Mezi tyto kovy patří chróm, kadmium, olovo a stříbro.

V roce 1977 R. R. Brooks vymyslel termín "hyperakumulátory". Definoval tak rostliny schopné akumulovat až 100x více kovu než neakumulující rostliny. První popsanou hyperakumulující rostlinou byla violka žlutá (*Viola calaminaria*) a penízeček rolní (*Thlaspi arvense*). Již v roce 1885 A. Baumann v nich identifikoval 1% zinku (v sušině) (Baumann, 1885). V roce 1948 O. Vergnano a C. Minguzzi objevili v Toskánsku neobyčejně vysokou koncentraci niklu v tařici (*Alyssum bertolonii*), až přes 1% (v sušině) (Minguzzi and Vergnano, 1948). O této rostlině se zmínil již v 16. století italský botanik Andrea Cesalpino, který ji popsal jako "Alyson" co roste na "black stones" (ultrabazické horniny) (Cesalpino, 1583). V posledním půlstoletí k identifikaci dalších hyperakumulujících rostlin přispěl rozvoj moderních analytických technik, zejména pak atomové absorpční spektrometrie.

Do dneška bylo popsáno okolo 450 rostlinných druhů – hyperakumulátorů – z více než 45 čeledí. Nejvíce druhů akumuluje nikl (viz tabulka Tab. 3), méně druhů pak akumuluje měď, kobalt, zinek a selen, a ještě méně již mangan a kadmium (Brooks, 1998a).

Světové rozšíření hyperakumulátorů je značně rozmanité. Většinou jsou to endemické druhy závislé na geologickém podloží a rostou výhradně na půdách s vysokou koncentrací kovů. Zajímavým příkladem endemického výskytu hyperakumulátorů je oblast Nové Kaledonie. Na tomto ostrově bylo nalezeno více jak 46 hyperakumulátorů z 6 čeledí a většina z nich jsou endemity. Byl zde identifikován i největší akumulátor kovů *Sebertia acuminata* (*Sapotaceae*). Modrozelený latex tohoto stromu může obsahovat až 25 % niklu (v sušině) (Jaffré and Brooks, 1976). Další pozoruhodností je, že hyperakumulátory nikdy nebyly nalezeny v oblastech předchozího zalednění, zřejmě proto, že 10 000 let není dostatečně dlouhá doba pro vývoj vlastností hyperakumulace (Brooks, 1998b). Nejznámějším a nejvíce prozkoumaným hyperakumulátorem je penízeček modravý (*Thlaspi caerulescens*), dokáže akumulovat více jak 3 % zinku (v sušině) bez známek poškození. Dále dokáže hyperakumulovat i olovo a kadmium (Lasat *et al.*, 2000).

Kov	Obsah kovu v sušině (%)	Počet druhů	Počet čeledí	Nejvíce zastoupené čeledě	Největší hyperakumulátor (Obsah kovu v sušině)
kadmium	>0,01	1	1	<i>Brassicaceae, Violaceae</i>	<i>Thlaspi caerulescens</i> (3,6 %)
kobalt	>0,1	28	11	<i>Lamiaceae, Scrophulariaceae</i>	<i>Haumaniastrum robertii</i> (10,2 %)
měď	>0,1	37	15	<i>Cyperaceae, Lamiaceae, Poaceae, Scrophulariaceae</i>	<i>Ipomoea alpina</i> (12,3 %)
olovo	>0,1	14	6	<i>Plumbaginaceae, Caryophyllaceae, Brassicaceae</i>	<i>Thlaspi rotundifolium</i> (8,2 %)
mangan	>1,0	9	5	<i>Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteaceae</i>	<i>Macadamia neurophylla</i> (51,8 %)
nikl	>0,1	317	37	<i>Brassicaceae, Cunoniaceae, Euphorbiaceae, Violaceae</i>	<i>Psychotria douarrei</i> (47,5 %)
chróm	>0,1	10		<i>Scrophulariaceae, Gramineae, Poaceae, Fabaceae, Myrtaceae</i>	<i>Leptospermum scoparium</i> (20,0 %)
zinek	>1,0	11	5	<i>Brassicaceae, Violaceae</i>	<i>Thlaspi calaminare</i> (39,6 %)
arsen	>0,1	8		<i>Polypodiaceae, Poaceae, Pinaceae, Campanulaceae, Ericaceae</i>	<i>Pityrogramma calomelanos</i> (8,4 %)
selen	>0,01	19		<i>Asteraceae</i>	<i>Astragalus pattersoni</i> (2,7 %)
kadmium	>0,1	1	1	<i>Brassicaceae</i>	<i>Iberis intermedia</i> (2,1 %)

Tab. 3: Tabulka hyperakumulátorů.

Rostliny si vyvinuly několik účinných mechanismů jak tolerovat vyšší koncentrace kovu v půdě. Koncentrace kovu, kterou rostlina toleruje, závisí na vnitřních (genetických) a vnějších (vliv prostředí) faktorech a je značně variabilní mezi druhy rostlin i kovů. Jsou dvě základní strategie, jak rostliny tolerují přítomnost vyšší koncentrace kovu v prostředí: 1) vyloučení, kdy je omezen transport kovu v rostlině a je udržovaná nízká hladina kovu v nadzemních částech rostliny při různé koncentraci kovu v půdě; a 2) akumulace, kdy je kov akumulován v netoxické formě v nadzemních částech rostlin na půdách s vysokou i nízkou koncentrací kovu. Akumulátory jsou omezeny jen na půdy s vysokou koncentrací kovu. Je zde ještě jeden typ rostlin, zvaný indikátory, u kterých koncentrace kovu v nadzemních částech odráží koncentraci kovu v půdě (Baker, 1981).

Je několik hypotéz o adaptivním významu hyperakumulace. Zajisté je hyperakumulace ekofyziologickou adaptací proti vysoké koncentraci kovů v prostředí. Je to tedy jakýsi projev tolerance ke kovům. Dále může zvyšovat rezistenci listů při nedostatku vody nebo může zvýhodňovat rostliny při alelopatických interakcích. Kovy se také mohou v rostlině akumulovat neúmyslně jako následek vysoké afinity kovu k ostatním přijímaným prvkům,

keré mohou být omezeny na mineralizovaných půdách. Asi nejvíce prozkoumanou a potvrzenou hypotézou je, že hyperakumulace kovů slouží jako obranný mechanismus proti herbivorům a patogenům (Pollard *et al.*, 2000).

Většina hyperakumulujících rostlin roste pomalu a produkuje málo biomasy. Další nevýhodou hyperakumulujících rostlin je akumulace pouze určitého kovu. Jen málo rostlin je schopno akumulovat více jak dva druhy kovů, nejvíce kovů akumuluje již zmíněný penízeček modravý (*Thlaspi caerulescens*), který dokáže hyperakumulovat zinek, kadmium a olovo. Hyperakumulátory tedy nenachází velké využití ve fytoremediaci. Většinou to jsou rostliny, které se vyskytují jen vzácně a na odlehlých místech, tak ani moc neznáme jejich fyziologii, možnosti šlechtění, aj.. Mohou však sloužit jako zdroj genetického materiálu a uplatnit se v biotechnologiích. Jednou z možností je přenos genů zodpovědných za hyperakumulaci do vysoce produktivních rostlin, nenáročných na pěstování (Cunningham *et al.*, 1996).



Obr. 5: Hyperakumulátory; **a** Zelený latex způsobený vysokou koncentrací niklu (*Sebertia acuminata*). **b, c, d** *Euphorbia helenaе*. Převzato z Callahan *et al.* (2006).

4. PŘÍJEM TĚŽKÝCH KOVŮ

Rostliny zpravidla nejvíce přijímají živiny a ostatní látky kořeny, k příjmu však může sloužit celý povrch rostliny, zejména listy tak přijímají látky z atmosféry. Jelikož rostliny dokáží přijímat jen volné ionty, tak kořeny do rhizosféry uvolňují cheláty a H^+ . Tyto kořenové exudáty ovlivňují rozpustnost prvků a jejich příjem do rostliny. Příjem prvků je ovlivněn enzymatickými procesy, koncentrací a formou, ve kterých se vyskytují, iontovou kompeticí a interakcí (Hall, 2002).

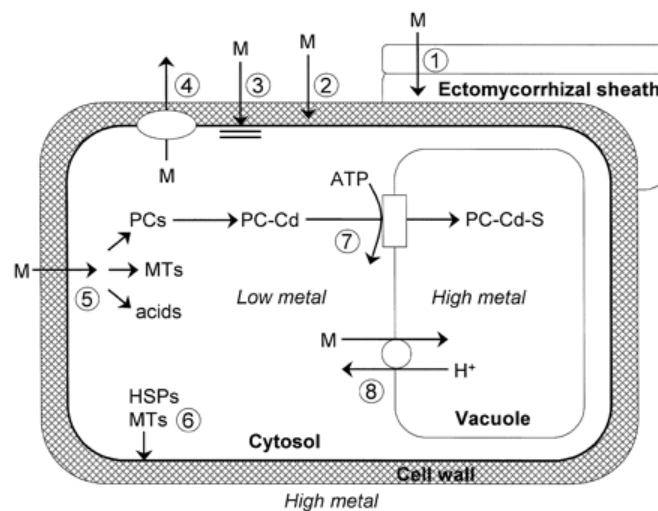
Kovy jsou v půdě povětšinou navázány na půdní částice, jsou tak nedostupné pro rostliny. Jak už bylo řečeno rostliny musí nejdříve kovy mobilizovat pomocí sekrece chelátů a H^+ . Chelatační činidla jsou látky, které obsahují negativně nabitě karboxylové skupiny nebo nukleofilní dusíkaté skupiny v takovém prostorovém uspořádání, že mohou vytvořit s kovovým iontem koordinační komplex. Příkladem takovýchto chelátorů jsou fyto siderofory u čeledi lipnicovitých (*Graminae*). Jejich syntéza je indukována nedostatkem železa. Dále se uplatňují i při mobilizaci zinku, manganu a mědi. Chelatace fyto siderofory jednak mobilizuje kovy v půdě, dále také pomáhá transportovat kovový iont přes plazmatickou membránu jako komplex kov-chelát pomocí speciálních přenašečů. U ostatních rostlin (vyjma čeledí lipnicovitých) se na plazmatické membráně při nedostatku železa indukuje syntéza reduktázy, která redukuje ionty (Fe^{III}) na (Fe^{II}), a ty pak přenašeč dopraví přes plazmatickou membránu (Salt *et al.*, 1998).

Takto mobilizovaný iont kovu může vstoupit do rostlinné buňky apoplastickou nebo symplastickou cestou, záleží na typu kovu a druhu rostliny. V symplastické cestě dochází k přenosu iontu přes plasmatickou membránu pomocí specifických přenašečů. Dnes se již ví, že tyto přenašeče hrají důležitou roli v toleranci rostlin ke kovům. Příkladem jsou přenašeče z rodiny ZIP. Zvýšení exprese genu ZNT1 přenašeče vedlo ke zvýšenému příjmu zinku kořeny, tím se tedy zvýšila i akumulace zinku v rostlině (Pence *et al.*, 2000).

Když se kov dostane do buňky může být uložen v kořeni a případně detoxifikován nebo může být xylémem transportován do nadzemních částí rostliny. V buňce může být kov uložen ve vakuole či může být navázán na buněčnou stěnu. Přes tonoplast je kov transportován přenašečem buď jako volný iont nebo jako komplex kov-chelát. Transport xylémem probíhá opět za účasti chelátorů. Hlavním transportérem v xylému je nikotinamin. Transport z xylému do listových buněk je opět přes specifické přenašeče. (Raskin *et al.*, 1994).

Příkladem chelátorů jsou fytochelatiny, metalothioneiny, organické kyseliny a aminokyseliny. Tyto ligandy hrají důležitou roli v obranném mechanismu proti toxickým účinkům kovů. (Salt *et al.*, 1998).

K největší akumulaci těžkých kovů dochází v kořeni, pouze část jich je transportována do nadzemních orgánů, kde jsou přednostně ukládány v trichomech (Lefevre *et al.*, 2009).



Obr. 6: Buněčný mechanismus detoxifikace a tolerance těžkých kovů; 1. Příjem pomocí mykorrhizy. 2. Navázání na buněčnou stěnou a kořenové exudáty. 3. Transport přes plazmatickou membránu. 4. Aktivní vyloučení do apoplastu. 5. Chelatace v cytosolu. 6. Ochrana a oprava buněčné stěny. 7. Transport komplexu PCs-kov do vakuoly. 8. Transport a akumulace iontu kovu ve vakuole. Upraveno podle Hall (2002).

5. VLIV TĚŽKÝCH KOVŮ NA METABOLISMUS ROSTLIN

Těžké kovy jsou příčinou značných změn v metabolismu rostlin. Primárním místem toxického účinku těžkých kovů jsou buněčné membrány a enzymy. Jejich poškození je příčinou dalších sekundárních změn jako je inhibice fotosyntézy, narušení příjmu minerálních látek a v neposlední řadě změny v metabolismu sacharidů.

Schutzendubel and Polle (2002) rozlišují tři hlavní molekulární mechanismy fytotoxicity těžkých kovů:

1. Produkce kyslíkových radikálů (ROS). Typické pro železo a měď.
2. Blokace funkčních skupin biomolekul. Charakteristické pro kadmium a rtuť.
3. Vytěsnění esenciálních kovů z biomolekul.

5.1. Vliv těžkých kovů na aktivitu enzymů

Těžké kovy způsobují změny v aktivitě enzymů. Některé enzymy inhibují, druhé naopak aktivují. Asche *et al.* (1989) definovali dva hlavní mechanismy inhibice enzymů kovem:

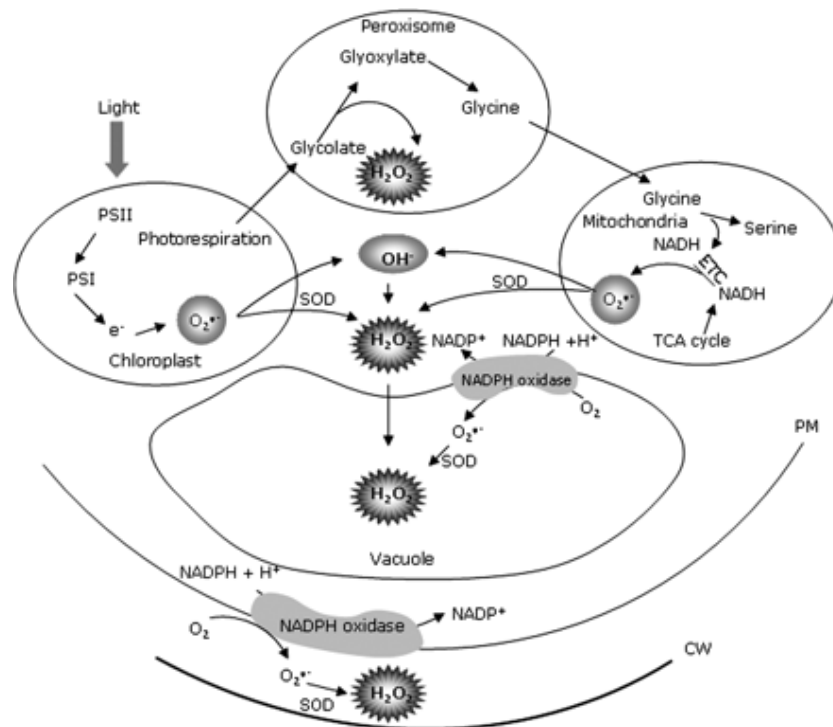
1. Navázání kovu na -SH skupinu.
2. Nedostatek esenciálního kovu či substituce za toxický kov v aktivačních místech enzymů.

Naopak indukce některých enzymů či zvýšení jejich aktivity hraje důležitou roli při rezistenci rostliny k těžkým kovům.

V přítomnosti chrómu byla zaznamenána snížena aktivita nitrátreduktázy (NR) u leknínu bílého (*Nymphaea alba*). Jednou z příčin může být inhibice biosyntézy chlorofylu, jelikož NR je aktivní jen v buňkách s funkčními plastidy, a nebo navázání těžkého kovu na -SH skupinu NR. Inhibice aktivity NR může mít za následek snížení syntézy proteinů (Vajpayee *et al.*, 2000).

5.2. Antioxidační obrana

Působení stresových faktorů může vyvolat u rostlin oxidativní stres, při kterém dochází k narušení redoxní rovnováhy přímou produkcí ROS, nebo produkcí či inhibicí antioxidačních látek. Největší množství ROS se vytváří v chloroplastech a mitochondriích, vznikají i v jiných membránových systémech (peroxizomy, glyoxizomy, tonoplast, plazmalema). U tabáku virginského (*Nicotina tabacum*) bylo zjištěno, že hliník narušil mitochondriální elektronový řetězec, čímž došlo ke zvýšené produkci ROS a úniku do cytosolu (Yamamoto *et al.*, 2003). ROS mají silně destruktivní účinky na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Ochranu před oxidačním poškozením organismu zajišťuje řada antioxidačních obranných systémů. Obranné mechanismy zahrnují enzymové i neenzymové antioxidy (Singh *et al.*, 2006).



Obr.7: Zdroje ROS (H_2O_2) v rostlinné buňce. CW – buněčná stěna, ETC – elektronový řetězec, H_2O_2 – peroxid vodíku, $OH\cdot$ - hydroxylový radikál, $O_2\cdot^-$ kyslíkový radikál, PS – fotosystém I a II, PM – plazmatická membrána, SOD – superoxiddizmutáza, TCA – Krejsův cyklus. Upraveno podle Van den Ende and Valluru (2009).

Tyto speciální enzymy se buď přímo setkávají s ROS (superoxiddismutáza (SOD), peroxidáza (POD), kataláza (CAT)), nebo udržují zásobu antioxidantů v redukovaném stavu (glutathionreduktáza (GR)). Antioxidační kapacita je velmi závislá na druhu kovu, stejně tak druhu a fyziologickém stádiu rostliny. U růžkatce ostnitého (*Ceratophyllum demersum*) byla při nižší koncentraci mědi zjištěna zvýšená aktivita askorbátperoxidázy (APX), CAT a SOD. Vyšší koncentrace kovu (4 μM) způsobila již snížení aktivity enzymů (Devi and Prasad, 1998). U rajčete (*Lycopersicon esculentum*) byla zjištěna odlišná aktivita antioxidačních enzymů v orgánech rostliny při zvýšené koncentraci mědi. Aktivita CAT se snížila jen v kořenech, zatímco v listech a stonku nedošlo k žádným změnám aktivity. Aktivita APX byla negativně ovlivněna jen v listech, v kořenech a stonku se aktivita enzymu nezměnila. Aktivita dalšího antioxidačního enzymu guaiakolperoxidázy (GPX) se výrazně zvýšila ve stonku, v kořenech se aktivita zvýšila již méně (Mazhoudi *et al.*, 1997).

Mezi neenzymové antioxidační mechanismy patří stimulace syntézy redukované formy glutathionu (GSH). Glutathion je prekurzorem pro fytochelatinu (PCs), což jsou malé peptidy bohaté cysteinem, které vážou kadmium a měď. PCs tvoří s kovy různé komplexy. Výsledkem je snížení volných iontů kovu uvnitř cytosolu (Grill *et al.*, 1985). U vodní kapradiny nepukalky vzplývavé (*Salvinia natans*) se při kontaminaci chromem zvýšil obsah GSH a snížil se obsah dalšího antioxidantu askorbátu (ASC) (Dhir *et al.*, 2009). GSH, ASC, thioly a karotenoidy chrání ostatní molekuly před ataky ROS (Devi and Prasad, 1998). U huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byly identifikovány další látky, které působí jako antioxidanty. Při kontaminaci kadmiem se zvýšil obsah α -tokoferolu, kampesterolu, beta-sitosterolu a isoflavonů. Tyto antioxidanty pomáhají zhaset ROS v chloroplastech (Sun *et al.*, 2010).

5.3. Vliv těžkých kovů na fotosyntézu

Těžké kovy mají inhibiční účinek na fotosyntetický aparát. Při kontaminaci dochází ke snížení obsahu fotosyntetických pigmentů jak chlorofylu tak i karotenoidů. Jednou z příčin je inhibice biosyntézy chlorofylu. U leknínu bílého (*Nymphaea alba*) došlo již při koncentraci 10 μM chrómu v hydroponickém médiu ke snížení aktivity dehydratázy kyseliny 5-aminolevulové (ALAD). Tento enzym katalyzuje přeměnu kyseliny 5-aminolevulové (ALA) na porfobilinogen (PBG), prekursor chlorofylu. Podle autorů může být redukce způsobena substitucí chrómu v aktivačním místě ALAD. Dále může být biosyntéza pigmentů negativně ovlivněna deficiencí železa (Vajpayee *et al.*, 2000). Jiné vysvětlení snížení obsahu chlorofylu podávají Devi and Prasad (1998), kteří jako příčinu označují degradaci thylakoidní membrány.

Inhibice světelné fáze fotosyntézy kovy je omezená na fotosystém II (PSII). Místem inhibice aktivity je nejspíše reakční centrum PSII. Degradace PSII může být způsobena stimulací produkce ROS nebo inhibicí translokace železa a jiných iontů (Appenroth *et al.*, 2003). Dhir *et al.* (2009) jsou přesvědčeni, že inhibice aktivity ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylázy (Rubisco) je hlavní příčinou snížení fotosyntetické aktivity. Inhibice aktivity Rubisca může být způsobena substitucí hořčíku v aktivním místě enzymu za iont kovu, změnou aktivity Rubisca z karboxylázové na oxygenázovou aktivitu nebo poškozením ROS.

5.4. Vliv těžkých kovů na metabolismus sacharidů

Sacharidy vznikají při fotosyntetické asimilaci CO₂. Jednak fungují jako zdroj energie a uhlíkatých řetězců pro syntézu dalších látek, dále se velmi aktivně účastní stresových reakcí a signalizačních drah. Jako signalizační molekuly mohou modulovat genovou expresi a aktivitu enzymů, tím mohou regulovat buněčný cyklus, a ovlivnit tak růst a vývoj rostlin. Obecně lze říci, že nízká koncentrace sacharidů v pletivech rostlin zvyšuje fotosyntézu, mobilizaci a export zásob, a naopak vysoká koncentrace sacharidů podporuje růst a skladování sacharidů (Koch, 1996). Sacharidy tak hrají důležitou roli v ochraně rostlin před proměnlivými vlivy prostředí. Při abiotickém stresu se sacharidy mohou v buňce hromadit jako osmoticky aktivní látky. Dále se mohou sacharidy hromadit jako osmoprotektanty, což jsou nízkomolekulární látky, které se akumulují při stresových podmínkách, svou vazbou na proteiny a membrány přispívají k zachování struktury makromolekul. Mezi osmoprotektanty řadíme sacharidy, aminokyseliny, kvartérní amoniové sloučeniny a polyaminy (Sun *et al.*, 2010). Při stresu rostlin těžkými kovy dochází ke změně obsahu jednotlivých sacharidů. Jejich hladiny i distribuce v rostlině se velmi liší, je zde i velká variabilita mezi druhy rostlin a typem kovu.

5.4.1. Distribuce sacharidů v rostlině

5.4.1.1. Sacharóza

Asi nejvýznamnějším sacharidem v rostlině je sacharóza. Tento disacharid (α -D-glukopyranosyl- β -D-fruktofuranosid) koná v rostlinném těle mnoho funkcí. Je to hlavní transportní sacharid v rostlinné říši, slouží jako zdroj uhlíku a energie, může být také skladován v zásobních orgánech a plodech. Působí též jako signální molekula a účastní se stresových reakcí jako osmoprotektant. Na rozdíl od fruktanů a sacharidů rafinózové řady (RFOs) má však menší účinek jako antioxidační sloučenina. Molekula sacharózy obsahuje méně hydroxylových skupin než fruktany nebo RFOs, tudíž má méně míst k navázání ROS (Van den Ende and Valluru, 2009). Dalším důvodem je ten, že při abiotickém stresu často nedochází tolik ke zvýšení koncentrace sacharózy oproti koncentraci např. RFOs nebo škrobu. Při stresu těžkými kovy dochází dokonce převážně ke snížení koncentrace sacharózy v rostlině. Příčinou je zvýšená přeměna sacharózy (neredukujícího cukru) na redukující cukry zejména hexózy (Costa and Spitz, 1997). Některé rostliny ovšem naopak zvyšují koncentraci sacharózy ve svých pletivech při kontaminaci těžkými kovy nebo sacharózu akumulují jen

v určitých orgánech. Příkladem může být okurka setá (*Cucumis sativus*), kde se při kontaminaci mědí sacharóza i škrob akumulovaly jen v listech. V kořenech nedošlo k akumulaci asimilátů, byla zde ale největší koncentrace mědi, která se zde ukládá. Měď má vliv na příjem minerálů a snižuje jejich transport, v listech je tak snižená koncentrace prvků potřebných při fotosyntéze. Nedostatek fosforu vede k redukci růstu listů, což se může odůvodnit zpětnovazebnou inhibicí fotosyntézy přes akumulaci asimilátů v listech. Úbytek hořčičku jen zesiluje inhibici fotosyntézy (Alaoui-Sosse *et al.*, 2004).

5.4.1.2. Škrob

Škrob (α -D-glukopyranosyl) je nejčastěji se vyskytující zásobní polysacharid. Těžké kovy mají rozdílný vliv na jeho množství v rostlinných pletivech. Zvýšená akumulace škrobu byla zaznamenána u sazenice rýže (*Oryza sativa*) při kontaminaci kadmíem (Verma and Dubey, 2001), arsenem (Jha and Dubey, 2005) a hliníkem (Mishra and Dubey, 2008), přičemž více se škrob akumuloval v nadzemních částech než v kořenech. U hrachu setého (*Pisum sativum*) se škrob také akumuloval převážně v nadzemních částech rostliny. Nižší koncentrace kadmia nijak negativně neovlivnila obsah škrobu ve vlčím bobu (*Lupinus albus*) pěstovaném *in vitro*. Při nízké koncentraci kadmia (do 0,1 μm v médiu) se výrazně zvýšilo množství škrobu v nadzemních částech a celkově se i zvětšila biomasa rostliny. Při vyšších koncentracích kadmia vlčí bob již redukoval svou biomasu a množství primárních metabolitů (Costa and Spitz, 1997). V prostředí kontaminovaném těžkými kovy klíčící rostliny mangrovníků (*Aegiceras corniculatum*) snížily obsah škrobu (Guangqiu *et al.*, 2007). Snížení obsahu škrobu bylo také zaznamenáno u semenáčků borovice lesní (*Pinus sylvestris*) na půdě s větším obsahem organické hmoty (Kim *et al.*, 2003).

5.4.1.3. Sacharidy rafinóзовé řady (RFOs)

Sacharidy rafinóзовé řady jsou α -galaktosyl deriváty sacharózy. RFOs jsou zejména transportní formy sacharidů u některých druhů rostlin, např. meloun cukrový (*Cucumis melo*), pochvatec ozdobný (afriická kopřiva) (*Coleus blumei*), ale účastní se i stresových reakcí. První krok syntézy RFOs katalyzuje galaktinolsyntáza (GoIS), což je i hlavní regulační bod přeměny mezi sacharózou a RFOs. RFOs se při kontaminaci těžkými kovy akumulují v rostlinných pletivech, jak již bylo uvedeno, dochází tedy ke zvýšené přeměně neredukujících cukrů zejména sacharózy na redukující (hexózy) (Costa and Spitz, 1997; Jha and Dubey, 2004). RFOs velmi dobře vytváří vodíkové můstky lépe než glukóza nebo

sacharóza, váží se tak na proteiny a membrány a zabraňují tím jejich poškození těžkými kovy (Sun *et al.*, 2010). V nedávné době byla objevena další funkce RFOs při stresu. Při stresu těžkými kovy dochází ke zvýšené produkci ROS. RFOs společnou interakcí s fenolickými látkami mohou přímo detoxifikovat ROS v chloroplastu a vakuole (Van den Ende and Valluru, 2010). U vlčího bobu (*Lupinus albus*) byla *in vitro* zjištěna vyšší koncentrace rafinózy, ale nižší koncentrace galaktózy při kontaminaci kadmíem. Galaktóza se uvolňuje z galaktolipidů při destrukci membrány. Vyšší obsah galaktózy v buňce je toxický, proto se při kontaminaci kadmíem zvyšuje zabudování galaktózy do rafinózy, čímž se zvyšuje koncentrace rafinózy. Dochází i ke zvýšení koncentrace hydroxylysinu a prolinu, což ukazuje na aktivní proteolýzu galaktolipidů (Costa and Spitz, 1997). Jiný mechanismus obrany má topol (*Populus spp.*), kde se galaktóza zabudovává rovnou do stachyózy, protože syntéza rafinózy je blokována kadmíem (Stobrawa and Lorenc-Plucinska, 2007).

5.4.1.4. Fruktany

Fruktany jsou rozpustné zásobní polysacharidy, které tvoří lineární či větvený řetězec fruktózových jednotek navázaných na molekulu sacharózy. Syntetizují se i odbourávají ve vakuole. Vyskytují se asi u 15 % rostlinných druhů, nejčastěji se nacházejí u čeledí lipnicovitých (*Poaceae*), hvězdnicovitých (*Asteraceae*) a liliovitých (*Liliaceae*). V rostlině hrají důležitou roli při abiotickém stresu. Jejich role při kontaminaci těžkými kovy je buď přímo zhaset kyslíkové radikály (ROS) vytvořené při stresu nebo nepřímo stimulovat další antioxidační mechanismy. Změny v koncentraci fruktanů korelují se změnami antioxidantů jako je GSH nebo ASC. Přímé zneškodnění ROS spočívá ve vytvoření oxidovaných fruktanových volných radikálů (OFFRs), které pak např. flavonoidy redukují znovu na fruktany (Van den Ende and Valluru, 2010). Délka fruktanových řetězců je ovlivňována nejen druhovou specifikou, ale i vnějším prostředím. Vyšší teplota vzduchu a akumulace železa v listech zvyšují množství fruktanů, zatímco prostředí s vyšší relativní vlhkostí vzduchu a vysokým množstvím znečištění (SO₂, NO₂) má negativní vliv na tvorbu řetězců. Roční období má také vliv na tvorbu fruktanů. Na jaře, v létě a na podzim se akumulují středně dlouhé fruktany, které slouží jako rychlý zdroj uhlíkatých řetězců a mohou být rychle mobilizovány při stresové situaci. Zatímco dlouhé řetězce fruktanů slouží jako dlouhodobé rezervy sacharidů (Sandrin *et al.*, 2008).

5.4.2. Aktivita enzymů sacharidového metabolismu

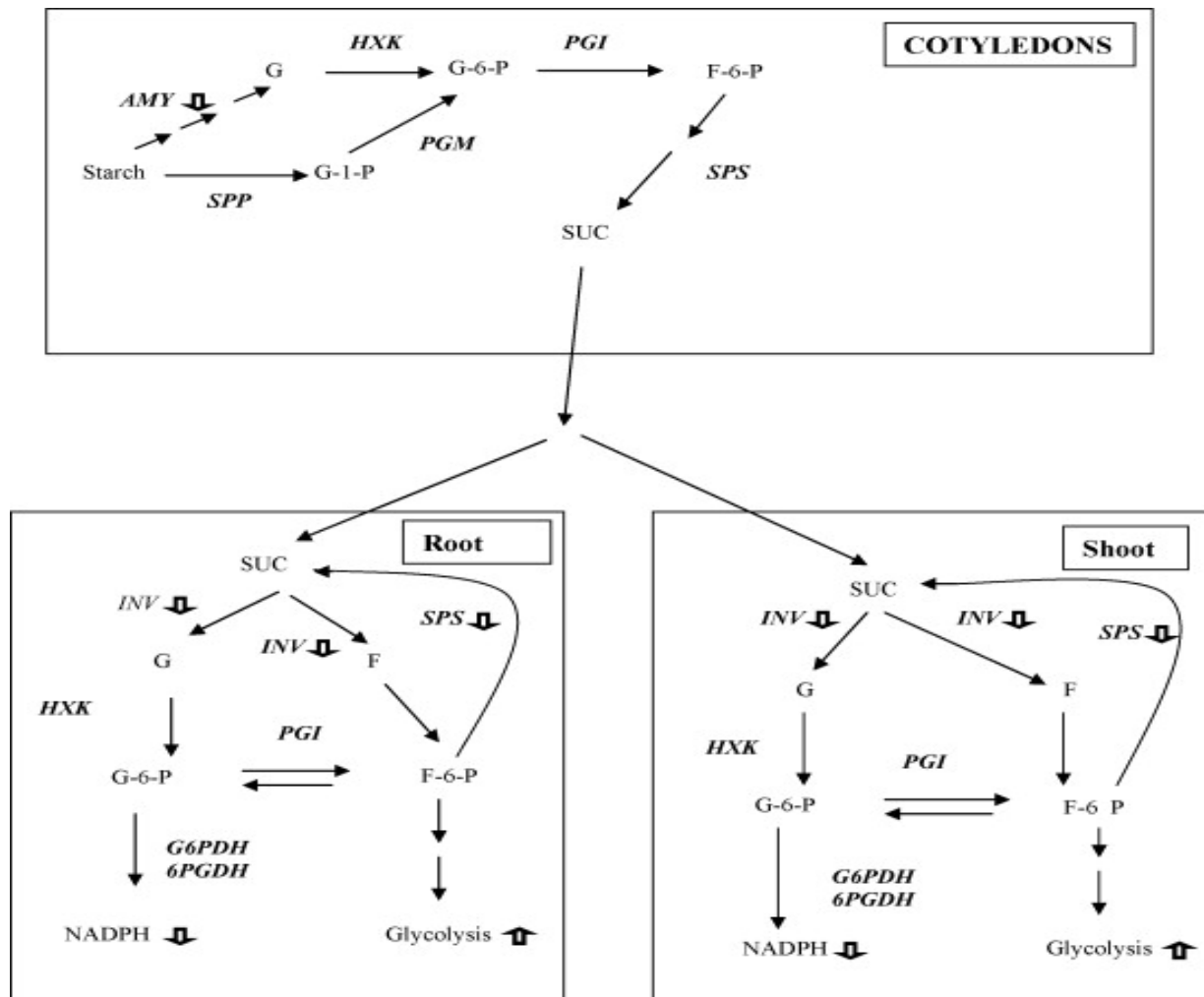
Hydrolytické štěpení škrobu je katalyzováno α -amylázou, β -amylázou a α -glukozidázou či fosforylázou škrobu. Tyto enzymy se nacházejí v plastidech. Těžké kovy způsobují razantní snížení aktivity těchto enzymů ve všech částech rostliny. Tím se vysvětluje zvýšená akumulace škrobu při stresu. Pokles aktivity hydrolytických enzymů škrobu byl pozorován u klíčících semen hrachu setého (*Pisum sativum*) při kontaminaci kadmíem (Devi *et al.*, 2007). U klíčící rýže (*Oryza sativa*) byla také zaznamenána inhibice α -amylázy a β -amylázy jak v endospermu, tak i v embryu při kontaminaci arsenem (Jha and Dubey, 2004; Jha and Dubey, 2005) i hliníkem (Mishra and Dubey, 2008). Devi *et al.* (2007) přiřazují tuto inhibici snížené dostupnosti vápníku, který je potřebný pro aktivitu α -amylázy.

Dalším důležitým enzymem v metabolismu sacharidů je sacharózafosfátsyntáza (SPS). Sacharózafosfátsyntáza katalyzuje biosyntézu sacharózy v cytosolu, funguje jako hlavní kontrolní bod biosyntézy sacharózy (Guo *et al.*, 2002). Kontaminace těžkými kovy snižuje aktivitu SPS ve všech částech rostliny. Výjimku představují klíčící semena hrachu setého (*Pisum sativum*), která vykazují při kontaminaci kadmíem sníženou aktivitu SPS v kořenech a stoncích, ale v dělohách se při kontaminaci aktivita SPS zvyšuje o 10 - 15 % (viz Obr. 8) (Devi *et al.*, 2007).

Enzymy sacharózasyntáza (SS) a invertáza (IT) se účastní degradace sacharózy. Tyto enzymy se liší produkty reakce. Sacharózasyntáza je glykosyltransferáza a produkuje fruktózu a UDP-glukózu. Invertáza je hydroláza, takže při jejím působení vzniká místo UDP-glukózy samotná glukóza. Invertáza může existovat ve více formách (isoenzymech), jejich aktivita závisí na pH prostředí katalyzované reakce. Invertázy ve vakuole a v buněčné stěně mají pH optimum reakce v kyselém prostředí, jsou to kyselé invertázy (AI). Naproti tomu neutrální nebo alkalická invertáza (NI) se vyskytuje v cytoplasmě (Koch, 2004). Aktivita enzymů degradujících sacharózu se zvyšuje při stresu způsobeném kovy. Působením kadmia byla zvýšena aktivita těchto enzymů u klíčící rýže (*Oryza sativa*) (Verma and Dubey, 2001). K zajímavým výsledkům se dobrali na Institutu dendrologie v Polsku. Porovnávali zde strategii přežití domácího a zavlečeného druhu topolu na půdě kontaminované těžkými kovy. Topol bavlíkový (*Populus deltoides*) je ve střední Evropě nepůvodní druh, má výhodu nad domácím topolem černým (*Populus nigra*) v tom, že jako zavlečený druh má v Polsku jen málo přírodních patogenů. Hypotézou tedy je, že topol bavlíkový, zavlečený druh, může tolerovat zkrácení růstové sezony kořenů na kontaminovaných plochách, protože nemusí vyvíjet obranné mechanismy proti patogenům. Tato hypotéza se potvrdila, topol bavlíkový

na kontaminované půdě již na začátku října zastavuje růst kořenů. V kořenech se snižuje aktivita SS, AI i NI. V kořenech topolu černého se aktivita SS, AI i NI zvyšuje, čímž se zvyšuje i koncentrace hexóz. Jelikož byla zjištěna snížená aktivita enzymů glykolýzy, tak tyto hexózy jsou nejspíše využity v syntéze dalších polysacharidů zejména polysacharidů buněčné stěny (kalózy a celulózy) a jiných látek např. sekundárních metabolitů (Stobrawa and Lorenc-Plucinska, 2007; Lorenc-Plucinska and Stobrawa, 2005).

V glykolýze a pentozafosfátovém cyklu (PPP) dochází k uvolnění energie ze sacharidů. Studie zabývající se vlivem těžkých kovů na tyto cykly se ve výsledcích velmi odlišují. U fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) byla při kontaminaci zinkem zjištěna indukce hlavních regulačních enzymů PPP glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PDH) a 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (6PGDH) (Asche *et al.*, 1989). U klíčícího hrachu byla při kontaminaci kadmiem zjištěna zvýšená syntéza NADPH v PPP jen v dělohách, v kořenech a stoncích se aktivita enzymů G6PDH a 6PGDH snížila (Devi *et al.*, 2007). V kořenech topolu bavlíkového (*Populus deltoides*) se aktivita G6PDH také snížila. Příčina inhibice G6PDH je pravděpodobně ve snížené koncentraci substrátů – glukózy, fruktózy a fosforylovaných hexóz (Lorenc-Plucinska and Stobrawa, 2005). Hexokinázy (HXKs) jsou jednak enzymy glykolýzy, které fosforylují hexózy na hexóza-6-fosfát, ale působí i jako molekuly generující signál (Jang *et al.*, 1997). U hrachu setého (*Pisum sativum*) bylo zjištěno jen nepatrné zvýšení hexokinázy (HK) i fruktokinázy (FK) ve všech částech klíčící rostlinky (Devi *et al.*, 2007). Jiná studie ukázala naopak snížení aktivity HK i FK (Chugh and Sawhney, 1999).



Obr. 8: Účinek kadmia na metabolismus klíčícího semene hrachu setého (*Pisum sativum*); ⬇ negativní regulace a ⬆ pozitivní regulace; AMY – amyláza, HXK – hexokináza, PGI – fosfoglukoisomeráza, PGM – fosfoglukomutáza, SPS – sacharózafosfátsyntáza, SUC – sacharóza, F – fruktóza, G – glukóza, G-6-P – glukóza-6-fosfát, F-6-P – fruktóza-6-fosfát, G-1-P – glukóza-1-fosfát, INV – invertáza, G6PDH – glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, 6PGDH – 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, PGI – fosfoglukoisomeráza. Upraveno podle Devi *et al.* (2007).

6. ZVÝŠENÍ ÚČINNOSTI FYTOREMEDIACE

Fytoremediace je svým způsobem zemědělský postup odstranění kontaminantů z životního prostředí. Pro zvýšení její účinnosti je důležitá dobrá znalost metabolismu rostlin a zemědělských praktik. Zvýšit účinnost můžeme hnojením půdy, přidáním syntetických chelátorů do půdy, selekcí rostlin a optimální hustotou jejich výsadby, střídáním plodin, zavlažováním a hubením škůdců. V této práci se více zmíním jen o některých technikách zvyšujících fytoremediaci. Velice důležitý je další výzkum. Například mnoho informací zatím není o optimalizaci doby sklizně. Výzkum je také potřebný pro identifikaci druhů vhodných pro remediaci (Lasat, 2002).

6.1. Syntetické chelátory

Aplikace syntetických chelátorů (většinou polyaminokarboxylové kyseliny) zvyšuje dostupnost kovů pro rostlinu tím, že chelátor na sebe kov naváže a tento komplex ligand-kov je pak lépe přijímán. Mezi syntetické chelátory patří ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), kyselina diethyltrinitrilopentaoctová (DTPA), kyselina nitrilotrioctová (NTA), kyselina trans-1,2-cyklohexylenednitrilotetraoctová (CDTA), kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA) a kyselina citrónová. Jako nejúčinnější syntetický chelátor se zdá být EDTA. Její aplikace do půdy zvýšila u hořčice (*Brassica juncea*) příjem olova i akumulaci kovu ve stonku, ale snížila růst rostliny (Epstein *et al.*, 1999). U slunečnice roční (*Helianthus annuus*) a kukuřice seté (*Zea mays*) byl zkoumán vliv inokulace houbou (*Glomus mosseae*) či kvasinkou (*Candida ernobii*) a nebo přidání syntetického chelátoru EDTA do půdy. Porovnávaly se aspekty jako růst rostlin, příjem těžkých kovů (Pb, Zn, Cu, Cd) a jejich translokace v rostlině. Ukázalo se, že aplikace syntetických chelátorů zvýšila akumulaci v rostlině nejen olova, ale i ostatních kovů (Zn, Cd, Cu). Aplikace EDTA sice zvýšila příjem zejména olova více než mikrobiální infekce, ale negativně působila na růst rostliny. Ošetření mykorrhizou vyšlo nejlépe, nejvíce se zvýšil příjem kovů (Zn, Cu a Cd), a to zejména u kukuřice. Po inokulaci kvasinkou se zvýšil příjem kovů o něco méně než u mykorrhizy, ale zvýšil se i růst rostlin. Absorbované kovy byly akumulovány spíše v kořeni, což je nevýhodné pro využití při fytoextrakci. Dále se ukázalo, že při aplikaci EDTA a u mykorrhizy rostliny více translokují kov do nadzemních částí, méně pak dochází k translokaci kovu v rostlině u inokulace kvasinkou. Celkově se kukuřice osvědčila více než slunečnice pro využití ve

fytoremediaci, zejména kvůli větší biomase a vyššímu příjmu kovů, ale i přesto je uplatnění těchto rostlin ve fytoremediaci jen malé. Jejich hodnota fytoextrakčního koeficientu je malá (Usman and Mohamed, 2009).

6.2. Půdní mikroorganismy

Mnoho studií dokazuje, že asociace rostlin s půdními mikroorganismy může potenciálně zvýšit účinnost fytoremediace. Již dlouho se ví, že půdní mikroorganismy dokáží měnit pH půdy a redoxní potenciál, tím zvyšují dostupnost kovů pro rostlinu. Dále zvyšují příjem a akumulaci kovů v rostlině sekrecí organických kyselin. Působení mykorrhizní asociace na příjem kovů ještě není úplně znám. Velmi záleží na druhu rostliny, mykorrhizní houby i kovu. Mezi mykorrhizní houby, které se vyskytují na půdách s vysokou koncentrací kovů, patří rod *Glomus spp.*, *Gigaspora spp.* a *Euthrospora spp.* (Lasat, 2002). Endomykorrhizní houba *Glomus verruciforme* byla zkoumána z hlediska vytváření asociace s pšenicí setou (*Triticum aestivum*). Rostliny s mykorrhizní asociací vykazovaly větší rezistenci k vyšší koncentraci kadmia. V pšenici se zvýšilo množství proteinů a rozpustných sacharidů ve stonku a kořeni, obzvláště v kořeni byl nárůst rozpustných sacharidů velmi drastický (Jamal-Abad and Khara, 2007). Negativní působení kadmia na mykorrhizní asociaci semenáčků borovice lesní (*Pinus sylvestris*) bylo zjištěno u infekce čechratkou podvinutou (*Paxillus involutus*) (Kim *et al.*, 2004). Záměrem této studie bylo určit, zda naakumulované kadmium v rostlině přímo působí na vytvoření mykorrhizní asociace. Semenáčky borovice byly nejprve pěstovány v kadmii kontaminované půdě a posléze přesazeny do čistého substrátu inokulovaného houbami. Míra infekce se poté stanovila podle množství a distribuci rozpustných sacharidů v rostlině. U semenáčků s mykorrhizou byla nižší koncentrace rozpustných cukrů v kořenech než u nemykorrhizních semenáčků. Kadmium tedy negativně ovlivňuje nejen rostlinu samotnou, ale i asociovanou houbu. Snížení výkonu obou partnerů může tudíž bránit rozvoji mykorrhizy, což by mohlo mít negativní dopad na obnovu borovicových lesů v zamořených oblastech (Kim *et al.*, 2004). I další studie dokazují protikladné efekty mykorrhizy na příjem a akumulaci kovů v rostlinách (více v review Kidd *et al.*, 2009).

6.3. Hnojení

Dalším vhodným prostředkem zvýšení fytořemediace je aplikace hnojiva jak statkového, tak průmyslového. Ve výzkumném ústavu pícninářském v Troubsku se zabývali využitím netradičních plodin pro fytořemediaci. Jako nejvhodnější plodinou pro odběr kadmia a olova se ukázal být sléz krmný (*Malva verticillata*) a žito svatojánské (*Secale cereale*). Aplikace kompostu u těchto plodin významně zvýšila příjem kovů rostlinami. Tyto rostliny jsou i nepříliš náročné na pěstování, takže jsou velmi vhodné pro sanaci půd (Badalíková *et al.*, 2009). Jiné zjištění měli Kim *et al.*, (2003), kteří studovali vliv složení půdy na toxicitu kadmia u semenáčků borovice lesní (*Pinus sylvestris*). Semenáčky, které rostly na půdě s vyšším obsahem organické hmoty byly sice méně postiženy kontaminací kadmíem, avšak akumulovaly méně kadmia než semenáčky, které rostly na půdě s minerálním podkladem. U těchto semenáčků byla zjištěna vyšší koncentrace rozpustných sacharidů, nižší koncentrace škrobu. Celková koncentrace všech nestrukturních sacharidů byla nižší, tato nižší hodnota nestrukturních sacharidů a zvýšení růstu stonku u semenáčků ukazuje, že sacharidy byly využity hlavně pro růst rostliny.

Použití průmyslových hnojiv při fytořemediaci předpokládá hlavně zvýšení biomasy. Bohužel v několika studiích se ukázalo, že aplikace dusíkatých hnojiv sice zvýší biomasu rostliny, ale sníží příjem kovu (Bennett *et al.*, 1998). Příznivé výsledky poskytla studie na mucholapce podivné pěstované *in vitro* (*Dionaea muscipula*). Autoři zde předpokládali, že přidáním sulfátu do média se posílí tolerance rostlin ke kadmii zvýšenou syntézou thiolů (GSH a PCs) a plumbaginu, což je hlavní sekundární metabolit mucholapky. Jejich hypotéza se potvrdila, sulfát zvýšil toleranci rostlin ke kadmii a dokonce i zvýšil akumulaci iontů kovu v rostlině (Babula *et al.*, 2009). Sodíkové hnojivo se také osvědčilo pro zvýšení akumulace kadmia v rostlinách. U jetele plazivého (*Trifolium repens*) a jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) se po aplikaci sodíkového hnojiva dokonce zdvojnásobila koncentrace kadmia v listech, stoncích a květenstvích. Ale již odlišný účinek u jetele a jílku mělo hnojivo na koncentraci stopových prvků a rozpustných sacharidů. U jílku se koncentrace rozpustných sacharidů zvýšila, u jetele se naopak jejich koncentrace snížila. Odlišné chování jetele a jílku autoři připisují v rozdílném mechanismu fixace dusíku (Chiy and Phillips, 1999). Správný výběr rostliny a hnojiva je tedy velmi důležitý pro dobré výsledky řemediace.

6.4. Transgenní rostliny

V poslední době se intenzivním polem zkoumání stalo užití geneticky modifikovaných rostlin při fytořemediaci. Za příjem kovů, translokaci a jejich uložení je odpovědných mnoho genů, exprese těchto genů by zajistila zvýšení účinnosti přirozených metabolických drah. Již v kapitole Hyperakumulátory jsem popsala možnost vnesení genů zodpovědných za hyperakumulaci do vysoce produktivních rostlin, nenáročných na pěstování. Více o transgenních rostlinách je napsáno v přehledových článcích (Kotrba *et al.*, 2009, Macek *et al.*, 2002).

7. ZÁVĚR

Znečištění půd těžkými kovy je stále velmi rozšířený fenomén. Poněvadž rostliny jsou přisedlé organismy, nemají oproti živočichům možnost úniku před kontaminací. Rostliny si tedy musely vytvořit důmyslné mechanismy obrany proti toxickým účinkům těžkých kovů. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o vlivu těžkých kovů na metabolismus rostlin s důrazem na metabolismus sacharidů. Metabolismus je sám o sobě dosti složitý systém procesů a je velmi variabilní u každého druhu rostliny. Souhrnně lze jen říci, že těžké kovy ovlivňují metabolismus rostlin na mnoha úrovních. Reakce rostlin na kontaminaci těžkými kovy je variabilní, liší se druh od druhu a je velmi závislá na druhu kovu a podmínkách prostředí. Detailnější poznatky mohou sloužit pro další rozvoj fytoremediace, jenž nám nabízí šetrný způsob odstranění kontaminantů ze životního prostředí. Stále ještě zůstává mnoho nezodpovězených otázek v této oblasti fyziologie rostlin, a je tedy potřeba dalších studií.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alaoui-Sosse B, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint ML, Epron D, Badot PM** (2004) Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science* **166**: 1213-1218
- Appenroth KJ, Keresztes A, Sarvari E, Jaglarz A, Fischer W** (2003) Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrhiza*: Electron microscopy and biochemical investigations. *Plant Biology* **5**: 315-323
- Assche F, Clijsters H** (1989) Effects of metals on enzyme activity in plant. *Plant Cell Environ.* **24**: 1-15
- Babula P, Ryant P, Adam V, Zehnalek J, Havel L, Kizek R** (2009) The role of sulphur in cadmium(II) ions detoxification demonstrated in in vitro model: *Dionaea muscipula* Ell. *Environmental Chemistry Letters* **7**: 353-361
- Badalíková B, Bartlová J, Hrubý J, Hartman I** (2009) Fytoremediační postupy s využitím netradičních plodin. *Metodika Výz. úst. picn. Troubsko a Zem. úst. Troub.* **7**: 1-15
- Baker AJM** (1981) Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutrition* **3**: 643-654
- Baumann, A** (1885) Das Verhalten von Zinksätzen gegen Pflanzen und im Boden. *Landwirtsch Vers.-Statn* **31**: 1-53
- Bennet FA, Tyler EK, Brooks RR, Gregg PEH, Stewart RB** (1998) Fertilisation of Hyperaccumulators to Enhance their Potential for Phytoremediation and Phytomining. *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals Ch.11*: 249-259
- Brooks RR, Lee J, Reeves D, Jaffré T** (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimen of indicator plants. *J. Geochemical Exploration* **7**: 49-77
- Brooks RR** (1998a) General Introd.. *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals Ch.1*: 1-14
- Brooks RR** (1998b) Geobotany and Hyperaccumulators. *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals Ch.3*: 55-94
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG** (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. of Biological Inorganic Chemistry* **11**: 2-12
- Cesalpino A** (1583). *De plantis libris Florentiae*: 369
- Chaney RL** (1983) Plant uptake of inorganic waste constituents, *Land Treatment of Hazardous Wastes*: 50-76
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM** (1997) Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 279-284
- Chiy PC, Phillips CJC** (1999) Effects of sodium fertiliser on the distribution of trace elements, toxic metals and water-soluble carbohydrates in grass and clover fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**: 2017-2024
- Chugh LK, Sawhney SK** (1999) Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Biologia Plantarum* **42**: 401-407
- Costa G, Spitz E** (1997) Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Science* **128**: 131-140
- Cunningham SD, Huang JW, Chen J, Berti WR** (1996) Phytoremediation of contaminated soils: Progress and promise. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **212**: 87-AGRO
- Devi R, Munjral N, Gupta AK, Kaur N** (2007) Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Environmental and Experimental Botany* **61**: 167-174
- Devi SR, Prasad MNV** (1998) Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a

- free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science* **138**: 157-165
- Dhir B, Sharmila P, Saradhi PP, Nasim SA** (2009) Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**: 1790-1797
- Dushenkov V, Kumar P, Motto H, Raskin I** (1995) RHIZOFILTRATION - THE USE OF PLANTS TO REMOVE HEAVY-METALS FROM AQUEOUS STREAMS. *Environmental Science & Technology* **29**: 1239-1245
- EPA (2000) Introduction to Phytoremediation. The U.S. Environmental Protection Agency
- Epstein AL, Gussman CD, Blaylock MJ, Yermiyahu U, Huang JW, Kapulnik Y, Orser CS** (1999) EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant and Soil* **208**: 87-94
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1985) Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* **230**: 674-676
- Guangqiu Q, Chongling Y, Haoliang L** (2007) Influence of heavy metals on the carbohydrate and phenolics in mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., seedlings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **78**: 440-444
- Guo JM, Jermyn WA, Turnbull MH** (2002) Carbon assimilation, partitioning and export in mature cladophylls of two asparagus (*Asparagus officinalis*) cultivars with contrasting yield. *Physiologia Plantarum* **115**: 362-369
- Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11
- ITRC (2001) Phytotechnology and Regulatory Guidance Document. Interstate technology and regulatory Cooperation
- Jaffré T, Brooks RR, Lee J, Reeves RD** (1976) *Sebertia acuminata* a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science* **193**: 579-580
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5-19
- Jamal-Abad AK, Khara J** (2007) Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Glomus veruciforme*) on Changes of Some Physiological Parameters in Cadmium Treated Wheat Plants. *Pakistan J. of Biological Sci.* **10**: 4279-4282
- Jha AB, Dubey RS** (2004) Carbohydrate metabolism in growing rice seedlings under arsenic toxicity. *Journal of Plant Physiology* **161**: 867-872
- Jha AB, Dubey RS** (2005) Effect of arsenic on behaviour of enzymes of sugar metabolism in germinating rice seeds. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 341-347
- Kidd P, Barcelo J, Bernal MP, Navari-Izzo F, Poschenrieder C, Shilev S, Clernente R, Monterroso C** (2009) Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 243-259
- Kim CG, Power SA, Bell JNB** (2003) Effects of cadmium and soil type on mineral nutrition and carbon partitioning in seedlings of *Pinus sylvestris*. *Water Air and Soil Pollution* **145**: 253-266
- Kim CG, Power SA, Bell JNB** (2004) Effects of host plant exposure to cadmium on mycorrhizal infection and soluble carbohydrate levels of *Pinus sylvestris* seedlings. *Environmental Pollution* **131**: 287-294
- Koch K** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Mol. Biology* **47**: 509-540
- Koch K** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 235-246
- Kotrba P, Najmanova J, Macek T, Ruml T, Mackova M** (2009) Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloids soil and sediment pollution.

- Biotechnology Advances **27**: 799-810
- Lasat MM, Kochian LV** (2000) Physiology of Zn Hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. Phytoremediation of contaminated soil and water Ch. **8**: 159-169
- Lasat MM** (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* **31**: 109-120
- Lefevre I, Marchal G, Meerts P, Correal E, Lutts S** (2009) Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany* **65**: 142-152
- Lorenc-Plucinska G, Stobrawa K** (2005) Acclimation of poplar trees to heavy metals in polluted habitats: I. Carbohydrate metabolism in fine roots of *Populus deltoides*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **74**: 11-16
- Macek T, Mackova M, Pavlikova D, Szakova J, Truksa M, Cundy S, Kotrba P, Yancey N, Scouten WH** (2002) Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnologica* **22**: 101-106
- Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal MH, ElFerjani E** (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Plant Science* **127**: 129-137
- McGrath SP, Dunham SJ, Correll RL** (2000) Potential for Phytoextraction of Zinc and Cadmium from Soils Using Hyperaccumulator Plants. Phytoremediation of contaminated soil and water Ch. **6**: 109-128
- Minguzzi C, Vergnano O** (1948) Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Allysum bertolonii*. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturale* **55**: 49-74
- Mishra P, Dubey RS** (2008) Effect of aluminium on metabolism of starch and sugars in growing rice seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 265-275
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DLD, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV** (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4956-4960
- Pollard AJ, Keri LD, Jhee ED** (2000) Ecological genetics and the evolution of trace element hyperaccumulation in plants. Phytoremediation of contaminated soil and water, Ch.**14**: 251-264
- Raskin I, Nanda Kumar PBA, Dushenkov S, Salt DE** (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 285-290
- Rugh CL, Wilde HD, Stack NM, Thompson DM, Summers AO, Meagher RB** (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 3182-3187
- Salt DE, Smith RD, Raskin I** (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 643-668
- Sandrin CZ, Figueiredo-Ribeiro RDL, de Carvalho MAM, Delitti WBC, Domingos M** (2008) Sub-tropical urban environment affecting content and composition of non-structural carbohydrates of *Lolium multiflorum* ssp *italicum* cv. Lema. *Environmental Pollution* **156**: 915-921
- Schutzendubel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365
- Singh S, Eapen S, D'Souza SF** (2006) Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* **62**: 233-246
- Soudek P, Petrova S, Benesova D, Kotyza J, Vanek T** (2008) Fytoremediation and

- possibilities of increasing its effectivity. *Chemicke Listy* **102**: 346-352
- Stobrawa K, Lorenc-Plucinska G** (2007) Changes in carbohydrate metabolism in fine roots of the native European black poplar (*Populus nigra* L.) in a heavy-metal-polluted environment. *Science of the Total Environment* **373**: 157-165
- Sun XM, Zhang JX, Zhang HJ, Ni YW, Zhang Q, Chen JP, Guan YF** (2010) The responses of *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure explored via metabolite profiling. *Chemosphere* **78**: 840-845
- Usman ARA, Mohamed HM** (2009) Effect of microbial inoculation and EDTA on the uptake and translocation of heavy metal by corn and sunflower. *Chemosphere* **76**: 893-899
- Vajpayee P, Tripathi RD, Rai UN, Ali MB, Singh SN** (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* **41**: 1075-1082
- Van den Ende W, Valluru R** (2009) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany* **60**: 9-18
- Verma S, Dubey RS** (2001) Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biologia Plantarum* **44**: 117-123
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H** (2003) Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil* **255**: 239-243
- Zayed A, Pilon-Smith E, D'Souza M, Lin Z, Terry N** (2000) Remediation of Selenium-Polluted Soils and Waters by Phytovolatilization. *Phytoremediation of contaminated soil an water* **4**: 61-84