

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Fytoremediace:

Strukturální charakteristiky rostlin
pod vlivem těžkých kovů



Marie Otradovcová

2010

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Konzultanti:

Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

RNDr., Mgr. Petr Soudek, Ph.D.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Laboratoř rostlinných biotechnologií

Poděkování:

Děkuji doc. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a obrovskou trpělivost. Moje velké díky patří také Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D. za velice přínosné připomínky v průběhu vypracovávání mé práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením doc. Jany Albrechtové a Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D.

V Praze dne 13.8.2010

Marie Otradovcová

Abstrakt

Znečištění životního prostředí těžkými kovy je velký problém současnosti. Zejména činností člověka obsah těchto kovů v půdách i vodách stoupá, především v méně vyspělých zemích. Lokální kontaminace jsou problémem i v našem státě. Zamoření půd těžkými kovy negativně ovlivňuje zemědělskou produkci a potravní řetězce v přírodě. Následně může mít neblahý vliv na lidské zdraví. Do popředí zájmu široké veřejnosti se dostávají možnosti odstranění těchto kovů z prostředí. Jednou z metod jsou fytořemediace, tedy odstranění kontaminantů pomocí rostlin. Jedná se o relativně novou, k životnímu prostředí velmi šetrnou, metodu. Avšak ne všechny rostliny jsou vhodné pro využití při fytořemediaci. Pro vytipování nejvhodnějších rostlinných druhů a jejich následné efektivní použití pro fytořemediaci je nezbytné studium vztahů mezi těžkými kovy a rostlinami, fyziologickými procesy, které ovlivňují příjem těžkých kovů a jejich distribuci v těle rostlin, působením těžkých kovů na anatomickou strukturu rostlin na různých úrovních jejich fungování. Zvláště přizpůsobené vysokým koncentracím kovů v půdě je skupina rostlin, tzv. hyperakumulátory. Jedná se o rostliny schopné ve svých nadzemních částech akumulovat taková množství kovů, která mnohem převyšují obsah kovů v půdě a v neakumulujících rostlinách. Tuto jejich vlastnost je možné využít při odstraňování kontaminantů z prostředí pomocí metod fytořemediace.

Cílem mé bakalářské práce je shrnutí vlivu těžkých kovů na rostliny s důrazem na změny v anatomické struktuře kořene a listu, které těžké kovy vyvolávají. Protože většina kovů je do rostliny přijímána kořeny, pozornost je věnována hlavně struktuře kořene. Nejstudovanějšími prvky ovlivňujícími vlastnosti rostlin jsou především kadmium, arzen, nikl a další, proto se předkládaná práce soustředí zejména na vliv těchto kovů na anatomickou strukturu rostlin. Vliv některých prvků řazených mezi těžké kovy na anatomickou strukturu však zatím nebyl téměř prostudován, například v dostupné literatuře se téměř nevyskytují informace o vlivu uranu na strukturu rostlin. Přitom kontaminace tímto prvkem jsou v důsledku antropogenních těžebních aktivit velmi rozšířené. Téma vlivu uranu na anatomickou strukturu rostlin proto patří k zajímavým tématům pro další studium a chtěla bych se na něj zaměřit ve své navazující diplomové práci.

Klíčová slova: fytořemediace, těžké kovy, kadmium, arzen, nikl, uran, anatomická stavba kořene, anatomická stavba listu, apoplastická bariéra

Abstract

The environmental pollution by heavy metals has been becoming currently a big problem. The contents of these metals in soils and water increase, particularly in consequence of human activities particularly in developed countries. Local contaminations are problematic in our country, too. Soil contamination by heavy metals negatively affects agricultural production and food chains in nature. It may have an adverse impact to human health. The general public is interested in possibilities of removing these metals from the environment. The phytoremediation is one of those methods for removal contaminants via plants. This is relatively new, environmentally friendly method. However, not all plants are suitable for use in phytoremediation. For the best selection of plant species and their subsequent effective use in phytoremediation is necessary to study the relationship between heavy metals and plants, physiological processes that affect the intake of heavy metals and their distribution in a plant body, effects of heavy metals on the anatomical structure of plants at different levels of functioning. A group of plants called hyperaccumulators is specially adapted to high concentrations of metals in soil. These plants are capable to accumulate in their aboveground parts quantities of metal greater than the metal contents in soil and non-hyperaccumulating plants. This feature is possible use in removing contaminants from the environment through phytoremediation techniques.

The aim of my Bachelor thesis is a summary of the impact of heavy metals in plants with emphasis on changes in the anatomical structure of roots and leaves induced by heavy metals. Since the majority of metals are taken into a plant by roots, attention is paid particularly to root structure. The most studied elements affecting the properties of plants are mainly cadmium, arsenic, nickel and others, thus, the focus of the present review is given to the effects of these metals on the anatomical structure of plants. The effect of some elements regarded as heavy metals on anatomical structures, however, has not been studied earlier. For example, to my knowledge, there has not been published a study in available literature containing information about the effect of uranium on plant structure. Nevertheless, contamination caused by this element in nature, is becoming common due to anthropogenic mining activities. The effects of uranium on plant anatomical structures, therefore, is one of the interesting topics for further study and, thus, the I want to focus on it in my following research.

Key words: phytoremediation, heavy metals, cadmium, arsenic, nickel, uranium, root anatomy, leaf anatomy, apoplastic barrier

Obsah

Abstrakt	2
Abstract	3
Seznam zkratek:	5
1. Úvod	6
2. Těžké kovy a rostliny	7
2.1. Příjem těžkých kovů rostlinami	8
2.2. Akumulace těžkých kovů rostlinami	8
2.3. Detoxifikace těžkých kovů rostlinami	10
3. Fytoremediace	11
3.1. Metody fytoremediací	12
3.1.1. Fytodekontaminace	12
3.1.1.1. Fytoextrakce (fytoakumulace)	12
3.1.1.2. Rhizofiltrace	13
3.1.1.3. Fytovolatilizace	14
3.1.1.4. Fytodegradace	14
3.1.2. Fytostabilizace	15
3.2. Hyperakumulátory	15
4. Vliv těžkých kovů na rostliny	16
4.1. Vliv těžkých kovů na růst rostlin a objem jejich biomasy	18
4.2. Vliv těžkých kovů na strukturu rostlin	19
4.2.1. Vliv těžkých kovů na morfologii a anatomii kořenového systému rostlin	19
4.2.2. Vliv těžkých kovů na morfologii, anatomii a fotosyntetickou aktivitu listů	25
5. Závěr	29
6. Seznam použité literatury	30

Seznam zkratek:

APX (ascorbate peroxidases) askorbátperoxidáza

ASC (ascorbate) askorbát

ASPP Americká společnost rostlinné fyziologie

CAT (catalase) kataláza

DW (dry weight) suchá hmotnost

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ethylendiamintetraoctová kyselina

GSH (glutathione) glutathion

PSII (photosystem II) fotosystém II

ROS (reactive oxygen species) reaktivní formy kyslíku

SOD (superoxide dismutase) superoxiddismutáza

TEM (Transmission Electron Microscopy) transmisní elektronový mikroskop

TSCF (transpiration concentration factor) transpirační koncentrační faktor

1. Úvod

Těžké kovy jsou v nízkých koncentracích běžnou součástí životního prostředí. Svůj původ mají v matečné hornině, jejímž zvětráváním a dalšími přirozenými geologickými činnostmi se šíří a dostávají do půd, vod i ovzduší. Mají široké praktické uplatnění v mnoha oblastech každodenního života lidí, proto jejich výskyt prudce stoupá právě činností člověka. K nebezpečnému znečištění životního prostředí těžkými kovy dochází především vlivem průmyslu a těžby, spalovacími procesy, zemědělskou činností (pesticidy obsahující měď, zinek či arzen; mořidla s obsahem mědi a rtuti, hnojiva s kadmíem) nebo čistírenskými kaly. Rizikové kovy mohou v půdě přetrvávat tisíce let, snadno se v přírodě akumulují, jsou dále nedegradovatelné a mohou se dostávat do potravních řetězců. Tím se stávají potenciálně nebezpečné i pro zdraví člověka. Různé prvky mají rozdílná cílová místa lidského těla, způsobují rakovinná bujení, ohrožují vnitřní orgány. Protože právě rostliny jsou prvním stupněm potravních řetězců, je naprosto nezbytné porozumět faktorům, které mají vliv na akumulaci těžkých kovů rostlinami.

Znečištění těžkými kovy a především možnosti jejich odstranění jsou velice aktuální problém řešený v mnoha zemích světa. V posledních desetiletích se jednou z možných metod stávají fytořemediace – tedy vyčištění různých substrátů od nebezpečných látek pomocí rostlin.

Cílem mé práce bylo formou literární rešerše shrnout vlivy těžkých kovů na rostliny, jejich fyziologické procesy a především na jejich strukturu ve vztahu k fytořemediacím. V první části práce jsem se zabývala obecným vlivem těžkých kovů na rostliny a možnostmi jejich odstranění pomocí různých technik fytořemediace. Ve druhé části jsem se detailně zabývala vlivem těžkých kovů na strukturu rostlin – především listu a kořene pod vlivem nejčastěji studovaných těžkých kovů – především kadmia, arzenu a niklu.

2. Těžké kovy a rostliny

Definice prvků, označovaných jako těžké kovy, není v literatuře jednotná. Existuje mnoho různých definic. Některé vyčleňují těžké kovy podle hustoty, protonového čísla, atomové hmotnosti nebo podle jejich toxicity. Nejčastěji jsou jako těžké kovy označovány prvky, jejichž hustota je větší než 5 g.cm^{-3} . Jedná se tedy o prvky: La, Ce, Pr, Zr, Hf, Th, V, Nb, Ta, Cr, Mo, W, U, Mn, Re, Fe, Co, Ni, Rh, Ru, Pd, Os, Ir, Pt, Cu, Ag, Au, Zn, Cd, Hg, Ga, In, Tl, Ge, Sn, Pb, As, Sb, Bi, Te, Tb (Adriano, 1986). Dále se mezi těžké kovy z důvodu podobných účinků na organismy řadí např. Al a Se, které však mají hustotu nižší. Proto se někdy místo označení těžký kov používá spojení toxický kov; tato definice je z hlediska působení těchto prvků na rostliny přesnější.

Některé kovy jsou pro rostliny esenciální, nezbytně nutné pro růst a vývoj rostliny, často jsou součástí metaloenzymů (Mg – karboxyláza; Fe – kataláza, peroxidáza; Cu – superoxiddismutáza, laktasa) a dalších proteinů. Fe, Mo a Mn jsou důležité mikroprvky, Zn, Ni, Cu, Co, Cr jsou důležité stopové prvky. Další prvky jako jsou As, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb a U nemají v rostlinách známé funkce, ale přesto je rostliny přijímají (Schutzendubel a Polle, 2002).

V přírodě se těžké kovy vyskytují v několika formách: jako volné ionty kovů a rozpustné půdní komplexy, ionty kovů specificky adsorbované na anorganické složky půdy, sraženiny nebo nerozpustné sloučeniny (oxidy, uhličitany, hydroxidy) nebo jako křemičité minerály (Macková a Macek 2005).

Fytotoxicita u některých kovů spočívá v jejich chemické podobnosti s esenciálními, tedy nezbytnými prvky (např. Cd – Zn, As – P, Se – S). Snadno dochází k záměně esenciálních kovů za toxické v proteinech nebo enzymech a je tak znemožněna jejich správná funkce. Dále může být toxicita způsobena vazbou kovů v proteinech na –SH skupinu, S – můstky nebo skupinu NH_3 , což vede k porušení jejich struktury a tím k inhibici aktivity. Nadbytek těžkých kovů může způsobit vznik ROS - volných kyslíkových radikálů (singletový kyslík - O_2^- , anion superoxidu - O^{2-} , peroxid vodíku - H_2O_2 , hydroxylové radikály $\text{OH}^\cdot$), které vyvolávají oxidativní stres. ROS především působí změny v proteinových řetězcích a způsobují peroxidaci lipidů v membránách vedoucí k porušení membránového systému buňky. Reakcemi s DNA dochází k nebezpečným mutacím. Obranou roli proti ROS hrají antioxidační enzymy: APX (askorbát peroxidasa), GPX (guaiacol peroxidasa), CAT (katalasa), SOD (superoxid dismutasa), GR (glutathion reduktasa) a antioxidační molekuly

jako je GSH (glutathion) nebo ASC (askorbát) (Gratao et al., 2005, Singh et al., 2007). Nejdůležitějším enzymem je superoxid dismutasa (SOD) převádějící superoxid na peroxid vodíku. Ten je následně detoxifikován katalasami, askorbátem, glutathionem, thioredoxinem nebo peroxidreduktasou.

Některé rostlinné druhy jsou přizpůsobeny k životu na půdách bohatých na kovy celou řadou mechanismů na buněčné úrovni. Různé metody detoxifikace způsobují odolnost rostlin vůči stresu vyvolanému působením těžkých kovů (Hall, 2002).

2.1. Příjem těžkých kovů rostlinami

Rostliny přijímají těžké kovy, stejně jako živiny, převážně z půdy svými kořeny. K příjmu však může docházet i jinými částmi rostlinného těla, např. listy z atmosféry.

Příjem kovů rostlinami nemá lineární závislost na celkovém obsahu kovu v půdě, ale na jeho přístupnosti (Schwartz et al., 2001). Kovy se v půdě nacházejí často ve formách nepřístupných pro rostliny. Je tedy nutná jejich mobilizace prostřednictvím chelátů a H^+ uvolňovaných do rhizosféry samotnými kořeny rostlin. Mezi chelátory patří např. fyto siderofory trav. Ty jednak kovy mobilizují a následně je pomáhají transportovat přes plasmatickou membránu dále do buňky. Mobilizovaný kov vstupuje do rostlinných buněk buď apoplastem nebo symplastem. V případě symplastické cesty, tedy aktivního přenosu, dochází k příjmu kovů pomocí specifických přenašečů. Naproti tomu transport kovů apoplastem je pasivní děj založený na difúzi. Jakým způsobem kov do rostliny vstoupí, závisí na formě kovu a druhu rostliny. Apoplastická cesta je méně regulována, roztoky procházejí přes buněčnou stěnu. Na přestupu z primární kůry do středního válce kořene jim tvoří bariéru endodermální vrstvy, které jsou spolu s exodermis součástí tzv. apoplastických bariér (Jabeen et al., 2009).

2.2. Akumulace těžkých kovů rostlinami

Mezi různými druhy rostlin existují v příjmu těžkých kovů rozdíly až několika řádů. Obecně platí, že jsou těžké kovy akumulovány především v kořenech. Mnohem menší množství kovu je dále transportováno do nadzemních částí rostlin, nejnižší koncentrace se vyskytují v generativních orgánech. Odlišná schopnost akumulace kovů se vyskytuje mezi různými druhy rostlin. (Tlustoš et al., 2006). Velký vliv na tuto schopnost má morfologie

kořene. Rostliny s velkým počtem tenkých kořenů mohou přijímat a tím pádem také akumulovat mnohem větší množství kovů než rostliny se silnými kořeny.

U fazolu zlatého (*Phaseolus aureus* Roxb.) bylo podle předpokladu akumulováno více arzenu v kořenech než v nadzemních částech. Při kontaminaci 50 μM As kořeny akumulovaly $0,37 \pm 0,025 \mu\text{g As g}^{-1}$, zatímco nadzemní části jen $0,017 \pm 0,013 \mu\text{g As g}^{-1}$ (Singh et al., 2007). U brukve řepky olejky (*Brassica napus* L.) rostoucí v půdě kontaminované kadmíem (100 mg Cd/kg) se vysoká koncentrace kadmia nacházela v listech (kolem 150 mg Cd/kg sušiny), srovnatelná byla i v kořenech. Naopak ve stoncích byla menší (Baryla et al., 2001). Martinka a Lux (2004) zjistili vysoké množství kadmia v kořenech silenky dvoudomé (*Silene dioica* L.), ale transport do nadzemních částí byl také značně omezen. Tento jev byl doprovázen rozdíly ve vývoji apoplastických bariér v kořenech. Při nízkých koncentracích kadmia byly Caspariho proužky blíže ke kořenové špičce. Tento jev bude podrobněji popsán v kapitole 4.2.1 Vliv těžkých kovů na morfologii a anatomii kořenového systému rostlin. I uran se v rostlinách hromadí převážně v kořenech, transfer do nadzemních částí je značně limitován (Dushenkov et al., 1997; Stojanović et al., 2008). Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.) akumuloval více než 2000 krát vyšší množství uranu v kořenech než v listech (Vanhoudt et al., 2008).

Vliv těžkých kovů na strukturu rostlin je často experimentálně testován jednotlivě pro různé kovy. Faktem ale je, že těžké kovy se v přírodě vyskytují obvykle ne jednotlivě, ale současně v různých kombinacích, což ovlivňuje jejich účinky na rostliny. Efekt těžkých kovů na rostliny může být ovlivněn přítomností dalších prvků, které s kovy interagují. Studována byla např. interakce zinku a kadmia, ke které dochází na základě jejich chemické podobnosti. Současná aplikace obou prvků snižuje příjem a akumulaci kadmia kořeny a tím snižuje jeho toxický účinek pro rostliny. Tento antagonistický efekt je způsoben menším iontovým poloměrem Zn^{2+} než má Cd^{2+} (Hart et al., 2002; Kummerova et al., 2010). Pokud koncentrace jednoho prvku překročí kritickou hranici toxicity, převažuje synergismus, i když koncentrace jednoho prvku je netoxická (Sharma a Agrawal, 2006). Bylo zjištěno, že při nízké koncentraci Zn (12 a 60 μM) současná přítomnost 12 μM Cd snižuje akumulaci zinku v kořenech heřmánku pravého (*Matricaria recutita* L.). Při vysokých koncentracích Zn (120 a 180 μM) při stejné koncentraci Cd došlo ke zvýšení obsahu zinku v kořenech (Kummerova et al., 2010).

2.3. Detoxifikace těžkých kovů rostlinami

Rostliny jsou někdy označovány jako “zelená játra” planety. Narozdíl od jater živočišných ale nemají efektivní cestu vylučování, látky jsou ukládány do vakuol (rozpustné formy) nebo do buněčných stěn (nerozpustné látky). Případně jsou vylučovány do extracelulárního prostoru (Kučerová et al., 1999).

Rostliny tolerantní vůči vysokému obsahu škodlivých látek dobře rostou i v místech, kde by ostatní rostliny nebyly vůbec schopné přežít. K této adaptaci využívají řadu mechanismů na buněčné úrovni k zajištění detoxifikace těžkých kovů a tím k získání tolerance vůči nim.

Úlohu v těchto mechanismech hrají především tyto faktory (Hall, 2002) :

- Mykorhiza
- Vazba kovů do buněčných stěn
- Extracelulární rostlinné exudáty
- Zabránění příjmu kovů plasmatickou membránou rostlinných buněk
- Chelatace kovů v cytosolu pomocí peptidů
- Exprese stresových proteinů
- Uložení kovů ve vakuole pomocí transporterů lokalizovaných v tonoplastu

U mykorhizních druhů rostlin může zvláště významnou roli při obraně rostlin proti těžkým kovům hrát zejména ektomykorhiza (Hall 2002). Mechanismus je založen na absorpci kovů povrchem hyf. Dochází tak ke snížení dostupnosti kovů pro příjem apoplastem rostlin. Účinek však nejde zobecnit; zatímco některé druhy hub snižují obsah kovů ve svých hostitelských rostlinách zabráněním jejich příjmu, jiné naopak zvyšují příjem kovů rostlinou (Hall, 2002).

Roli při obraně rostlin proti těžkým kovům má i buněčná stěna, kam mohou být kovy také ukládány. Kapacita buněčné stěny pro absorpci imobilizovaných kovů je však značně limitována. Důležitým mechanismem detoxifikace kovů v cytosolu je chelatace. Chelátory ve spolupráci s chaperony zabraňují dalším reakcím kovů v cytosolu buněk. Mezi nejdůležitější chelátory patří peptidy bohaté na cystein – fytochelatiny a metallothioneiny, dále pak organické kyseliny a aminokyseliny (např. Clemens, 2001).

3. Fytoremediace

Pojem fytoremediace (z řeckého slova phyto = rostlina a latinského remedium = čistit) označuje metody využití rostlin k fixaci, akumulaci a rozkladu nebezpečných kontaminantů (těžké kovy, radionuklidy, explosiva, barviva, pesticidy, léčiva a další), které zatěžují životní prostředí. Cílem je tyto látky odstranit z kontaminovaných substrátů, jimiž mohou být voda, půda, sedimenty či kaly. Zkoumaná je i možnost čištění vzduchu. Látky mohou být odstraněny přímo nebo degradovány na méně nebezpečné nebo zcela neškodné formy. Jedná se o přírodní atenuace, které využívají přirozených vlastností rostlin.

Fytoremediace může sloužit jako alternativa ke klasickým způsobům odstranění kontaminantů pomocí těžké techniky, kdy dochází k silnému narušení krajiny a životního prostředí a v neposlední řadě je to i velmi finančně nákladné. Fytoremediace má své výhody i nevýhody, které jsou do určité míry způsobeny nedostatečnou znalostí příjmu a akumulace kovů rostlinami. Mezi jednu z hlavních výhod patří to, že jde především o levnou a šetrnou in situ metodu využívající běžně zavedené agrotechnické postupy. Vstupní náklady jsou velmi nízké. Podle Americké společnosti rostlinné fyziologie (ASPP) klasické způsoby dekontaminace půdy stojí přibližně 1000 dolarů na 1 tunu půdy. Čištění pomocí metod fytoremediace stojí průměrně 30 dolarů za 1 tunu půdy. Částky jsou to průměrné a záleží na mnoha faktorech. Podle ASPP při fytoextrakci (jedna z nejčastěji používaných metod, viz kapitola Metody fytoremediací) je nutné počítat s 25-100 dolary za tunu přečištěné půdy, při jiné metodě, tzv. rhizofiltraci, s 0,6 – 6 dolary za 1000 galonů (3785 litrů) znečištěné vody (Demnerová, 2003). Mezi další výhody fytoremediace patří možnost odstranění různých druhů kontaminantů, kdy u organických může být docíleno až jejich úplné mineralizace. Energie na provoz je získávána přímo ze slunečního záření. Metoda má i estetický přínos, minimálně zatěžuje prostředí a při dostatečné obeznamenosti by měla být dobře přijímána veřejností (Kučerová et al., 1999). Nevýhodou je časová náročnost, malé rozměry vhodných hyperakumulátorů, jejich pomalý růst a malá prostudovanost, nízký transport rostlinou, akumulace látek především v kořenech a riziko přenosu toxických prvků do dalších stupňů potravního řetězce. Účinnost metody je ve velké míře ovlivněna řadou faktorů, jako je struktura půdního profilu, pH, koncentrace solí, polutantů a dalších faktorů. Dekontaminace může být dále negativně ovlivněna změnou životních podmínek (kyslík, voda, živiny) (Kučerová et al., 1999). Nutností je zabránit rozšíření kontaminace (např. spadané listy, které může dále rozšiřovat kontaminaci). Některé problémy by bylo možné řešit genetickými úpravami rostlin, který by vedly ke zvýšení akumulace či degradace škodlivých látek.

Fytoremediace se nejlépe uplatňuje v místech, kde je nízký až střední stupeň kontaminace. V místech silně znečištěných má veškerá flora těžké podmínky k růstu. V případě znečištění půdy také záleží na hloubce, do které kontaminace pronikla (Schnoor et al., 1995; Prasad a Freitas 2003).

3.1. Metody fytořediací

Metody fytořediací lze rozdělit do dvou skupin technologií: fytořekontaminační a fytořtabilizační. Fytořekontaminace spočívá v přímém odstranění kontaminantu. Patří sem fytoextrakce, řhizofiltrace, fytořegradace a fytořvolatilizace. V dalších podkapitolách budou tyto pojmy vysvětleny a metody popsány. Při fytořtabilizaci není kontaminant přímo odstraněn, ale je znemožněn jeho řenos do okolí jeho řtabilizací přímo v řostlinných orgánech (Cunningham et al., 1995).

3.1.1.Fytořekontaminace

3.1.1.1.Fytoextrakce (fytoakumulace)

Tato metoda je založena na řromadění polutantu v nadřzemních řástech řostlin (ve vakuolách nebo buněčných řtěnách). Používá se řředevším pro řtěžké kovy (Cunningham et al., 1995).

Při fytoextrakci jsou na řkontaminovanou plochu řyřety řvhodné řrostliny, řvysoce řtolerantní k nadřměřnému množřtví kovů v půdě. Následně jsou spolu s naakumulovaným řkontaminantem řsklizeny a řdále řzpracovávány, např. ve řspalovnách. Se řvzniklým řpopelēm musí být řnakládáno jako s řnebezpečným řodpadem. Postup je řopakován, až do řúplného řvyčiřřtění řplochy. Řzákladním řpředpokladem řúspěřšné řfytoextrakce je řsprávný řvýběř řrostliny. Řprvní řmožností je řpoužití řhyperakumulátorů – řrostlin s řvysokou řschopností řakumulovat kovy. Řřastou řnevýřhodou jsou řjejich řmalé řrozměry. Řřdruhou řmožností je řvýřsev řrostlin s řobvyklou řmírou řakumulace, ale řvelkým řnárůstem řbiomasy (*Zea mays*, *Helianthus annuus*).

Pro snadnější příjem kovů rostlinami je možné využít různé přísady do půdy, chelátory, zvyšující pohyblivost nebo rozpustnost kovů. Velice účinná je např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (např. Jabeen et al., 2009).

Hlavním problémem použití hyperakumulujících druhů je čas. Bylo prokázáno, že penízek modravý (*Thlaspi caerulescens*), v současné době nejprostudovanější známý hyperakumulátor, by při optimálních podmínkách a při běžně se vyskytujících koncentracích kontaminace zinkem potřeboval třináct až čtrnáct let k vyčištění kontaminovaného místa. Aby fytoextrakce mohla být považována za úspěšnou, musela by rostlina poskytovat 3 tuny sušiny z hektaru ročně a ve sklíditelné části akumulovala přes 1000 mg kovu na 1 kg sušiny (Macková a Macek, 2005).

Účinnost příjmu se označuje jako TSCF – transpirační koncentrační faktor. Vyjadřuje poměr mezi koncentrací sloučeniny v transpiračním proudu rostliny a koncentrací v půdní vodné fázi (Macková a Macek, 2005).

S touto metodou úzce souvisí další praktické využití – biotechnologie fyto-mining (fytodobývání, fyto-dolování) – jde o zpětné získání prvků, “těžbu” kovů z rostlin. Ekonomicky výhodný se zdá být např. fyto-mining niklu rostlinou *Alyssum bertolonii* (Robinson et al., 1997). Pro tuto metodu je zvláště nutné použití rostlin s dostatečnou tvorbou biomasy a současně akumulující velké množství kovu.

3.1.1.2. Rhizofiltrace

Další metodou je rhizofiltrace, při níž jsou odstraňovány škodliviny z proudící vody pomocí kořenů rostlin. Tento způsob je zvláště úspěšný pro odstraňování radionuklidů (U, Pu, Sr, Cs, I) (Dushenkov et al., 1997, Tome et al. 2008) i těžkých kovů (Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn) (Dushenkov et al. 1995). Ideální rostlina pro tuto metodu by měla rychle růst, hlavní podíl biomasy by měl být soustředěn v kořenech a především musí být schopná odstraňovat kontaminanty z roztoku. Efektivní je použití rostlin jako jsou brukev sítinovitá (*Brassica juncea*) nebo slunečnice roční (*Helianthus annuus*) především díky jejich rozvinutému kořenovému systému s velkou plochou zajišťující zvýšený příjem kovů (Dushenkov et al., 1995). Možné je využít i vodních rostlin, jejich častou nevýhodou je opět malý vzrůst a také krátké kořeny – vodní hyacinth (*Eichhornia crassipes*) (Kay et al. 1984, Prasad, Freitas 2003) nebo okřehek menší (*Lemna minor*) (Mo et al. 1989, Prasad, Freitas 2003). Nezbytné je, aby vybrané rostliny byly k těžkým kovům tolerantní a nebyly u nich patrné známky fyto-toxicity.

Podle nové studie Appenroth et al. (2010) okřehek menší (*Lemna minor*) ani závitka mnohokořenná (*Spirodelra polyrhiza*) nejsou konkrétně vhodné pro odstranění niklu z kontaminované vody z důvodu projevů fytotoxicity vlivem tohoto prvku.

3.1.1.3.Fytovolatilizace

Při fytovolatilizace dochází k transpiraci těkavé formy kovu, ionty kovu jsou uvolňovány přes průduchy. Kontaminant tedy není zcela odstraněn, ale pouze rozptýlen do atmosféry. Některé rostliny rostoucí v substrátech s vysokým obsahem selenu (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*) volatilizují selen buď ve formě dimethylselenidu nebo dimethyldiselenidu (Jabeen et al., 2009). Dále může být metoda použita např. k zneškodnění kontaminace rtutí. V tomto testovaném případě nebyla využita přirozená vlastnost rostliny, ale bylo použito geneticky modifikovaných rostlin. Bakteriální gen reduktasy rtuti MerA byl vpraven do genomu huseníčku polního (*Arabidopsis thaliana*). Reduktasa přeměňuje toxickou formu Hg^{2+} na méně nebezpečnou formu Hg^0 , která byla rozptýlena do atmosféry. Současně se zvýšila odolnost rostliny proti působení rtuťnatých iontů. V tomto směru je výsledek rozporuplný, neboť rtuť stále zůstává v přírodě. (Rugh et al., 1996). Naopak výhodou jsou velice nízké náklady, protože kontaminant mohou odstraňovat stále stejné rostliny, není nutná jejich sklizeň.

3.1.1.4.Fytodegradace

Fytodegradace se dá použít pouze pro zneškodnění organických látek. Anorganické látky dále degradovatelné nejsou. Kontaminant je převeden na méně nebezpečnou nebo zcela nefytotoxickou látku činností enzymů (dehalogenázy, mono- a dioxygenázy, peroxidázy, peroxigenázy, karboxylesterasy, lakázy, fosfatázy, nitroreduktázy) schopných modifikovat organické látky vytvářením postranních skupin na organických sloučeninách a tím je zvýšena jejich rozpustnost a umožněna konjugace (Macková a Macek, 2005). Některé rostliny jsou schopné převést organickou látku až na základní stavební kameny a ty použít pro svůj růst. Naopak je třeba zajistit, aby nevznikaly produkty ještě toxičtější než samotné výchozí látky.

3.1.2. Fytostabilizace

Cílem této metody není přímé odstranění kontaminantu, ale je zabráněno jeho šíření především v místech eroze půdy nebo při riziku jeho vyplavování. Toxické látky jsou imobilizovány především činností kořenového systému, kde dochází k jejich akumulaci, srážení nebo redukci (Shah a Nongkynrih, 2007). Příkladem může být redukce rozpustného rizikového Cr^{VI} na nerozpustný Cr^{III} (James et al., 1996).

Strategie může být také využita pro přípravu kontaminované plochy před dekontaminací jinou metodou. Používá se i při regulaci průtoku kontaminované podzemní vody půdním sedimentem a při jejím zadržování v problémové oblasti, např. vysázením některých rychle rostoucích dřevin s rozsáhlým kořenovým systémem, jenž odsává značné množství vody (Kučerová et al., 1999). Jednou z metod fytostabilizace je tzv. hydraulická kontrola. Využívá obvykle stromů s hlubokými kořeny (topol, vrba), které vysávají velká množství vody, tu vypařují do atmosféry, tak udržují půdu sušší a tím zabraňují migraci kontaminantů (např. anorganické látky, chlorovaná rozpouštědla) do spodních vod a vytvářejí tak hydraulickou bariéru (Macková a Macek, 2005).

3.2. Hyperakumulátory

Rostliny můžeme rozdělit podle jejich vztahu k akumulaci těžkých kovů na “metal excluders” a “metal non-excluders”. Exkludery jsou rostliny udržující kovy ve svém kořenovém systému, do nadzemních částí je téměř netransportují (Seregin, Kozhevnikova, 2008). Patří sem především jednoděložné rostliny (např. kostřava, čirok dvoubarevný). Druhou skupinou jsou “metal non – excluders” – rostliny hromadící kovy v nadzemních částech. Dělí se na indikátory a hyperakumulátory. U indikátorů je obsah kovů ekvivalentní k obsahu kovů v půdě (např. většina zemědělských plodin – pšenice, oves, kukuřice) (Tlustoš et al., 2006).

Hyperakumulátory byly definovány jako rostliny koncentrující v nadzemních částech množství kovu, které vysoce převyšuje obsah kovů v půdě a v neakumulujících rostlinách bez negativního vlivu na jejich růst a vývoj. Termín byl zaveden Brooksem (Brooks et al., 1977). Jako hyperakumulátory se označují druhy akumulující 0,1 % (d.m.) Ni, Co nebo Pb; 1 % (d.m.) Zn, Mn a 0,01 % (d.m.) Cd. Některé případy hyperakumulace jsou extrémní – například latex stromu *Sebertia acuminata* obsahuje až 11 % niklu (Chaney et al., 1997). První objevený hyperakumulátor niklu, zástupce rodu tařic, *Alyssum bertolonii* (obsahoval 10000 μg^{-1} v sušině) znamenal začátek zájmu o tuto problematiku (Minguzzi a Vergnano, 1948;

Assunção et al., 2003). Studium hyperakumulátorů je velmi zajímavé, ať již z ekologických, evolučních nebo výživových důvodů nebo z pohledu životního prostředí. Nejvýznamnější praktické využití hyperakumulátorů spočívá právě v jejich použití při fytoremediacích.

Dnes je známo přes 450 druhů hyperakumulátorů patřících především do těchto čeledí: *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cyperaceae*, *Cunouniaceae*, *Fabaceae*, *Flacourtiaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Violaceae*, and *Euphobiaceae*. Vůbec nejvíce hyperakumulátorů náleží do čeledi *Brassicaceae* (11 rodů, 85 druhů). Nejčastěji se vyskytují hyperakumulátory Ni (7 rodů, 72 druhů) a Zn (3 rody, 20 druhů). U rodu *Thlaspi* se často vyskytuje akumulace více než jednoho prvku: penízek modravý (*T. caerulescens*) ve zvýšené míře přijímá Cd, Ni, Zn; *T. goesingense* a *T. ochroleucum* Ni, Zn; *T. rotundifolium* (penízek okrouhlolistý) Ni, Zn a Pb (Prasad et al., 2003). *T. caerulescens* se díky své blízké příbuznosti s *Arabidopsis thaliana* zdá být vhodným modelovým organismem pro hyperakumulace (Assunção et al., 2003), ze všech hyperakumulátorů je také nejvíce prostudován. Většina hyperakumulátorů jsou endemické druhy, zvláštností je velmi vysoký počet objevených akumulátorů na Nové Kaledonii – 46 druhů patřících do 6 čeledí.

Jeden z názorů na vznik hyperakumulace u rostlin je založen na hyperakumulaci jako mechanismu obrany proti herbivornímu hmyzu. Tato představa byla potvrzena například studií hodnotící potravní chování pouštní kobylky *Schistocerca gregaria* k hyperakumulátoru zinku penízku modravému (*Thlaspi caerulescens*) – kobylky preferovaly potravu s nízkými koncentracemi zinku (Behmer et al., 2005).

Hyperakumulátory jsou významné nejen pro fytoremediace, ale dají se využít i při biogeochemickém vyhledávání prvků. Také se u nich vyskytují alelopatie (vyplavené sloučeniny kovu potlačují růst rostlin v okolí) (Prasad et al., 2003, Boyd et al., 1994).

4. Vliv těžkých kovů na rostliny

Kovy se liší ve svých efektech na fyziologické procesy rostlin, obvykle způsobují rostlině stres, projevující se např. určitým druhem oxidativního poškození. Výsledkem jsou změny ve struktuře rostlin, které jsou často podobné nebo stejné pro různé prvky. Mezi nejčastěji studované prvky, nejen v souvislosti s jejich vlivem na strukturální charakteristiky rostlin, patří především kadmium, nikl, arzen, měď a další prvky.

Těžké kovy způsobují poškození na různých úrovních rostlinného těla. Průvodním jevem je např. poškození buněčných membrán. Je způsobeno peroxidací membránových lipidů, čímž je narušena integrita a funkce membrán (Vanhoudt et al., 2008). Např. Arduni et al. (1995) pozorovali poškození buněčných membrán u borovic *Pinus pinaster* a *P. pinea* vystavených působení 1 mM Cu. Vanhoudt et al. (2008) zjistili narušení membrán u *Arabidopsis thaliana*. Současně byl pozorován únik draslíku, což je právě indikátor nestability membrán.

Dalším případem negativního vlivu těžkých kovů na rostliny je častá inhibice klíčení pylu a růstu pylové láčky. Pyl je ve srovnání s ostatními buňkami rostlin extrémně citlivý na působení polutantů. Kadmium v nízkých koncentracích způsobuje mírnou stimulaci klíčení pylu, při vyšších koncentracích (10^{-2} M) klíčení pylu naopak zastavuje. Bylo pozorováno, že toxický efekt na dvouděložný tabák virginský (*Nicotiana tabacum*) je větší než na jednoděložnou lilii dlouhokvětou (*Lilium longiflorum*) (Sawidis et al., 2008). Naproti tomu Munzuroglu a Geckil (2002) pozorovali toxičtější efekt kadmia při inhibici klíčení u pšenice (*Triticum aestivum* L.) než u okurky (*Cucumis sativus* L.) (Munzuroglu a Geckil, 2002). Také pylová láčka vykazuje růstové abnormality, zejména roste nerovnoměrně.

Tyto příklady dokazují negativní důsledky působení těžkých kovů na různých místech rostlinného těla. V dalších kapitolách se budu podrobněji zabývat vlivem těžkých kovů na kořeny a listy rostlin.

Příkladem výskytu současného zvýšení koncentrací více těžkých kovů najednou volně v přírodě může být výskyt strusky po různých těžebních aktivitách. Substrát následkem toho obsahuje rezidua těžkých kovů. Ryser a Emerson (2007) zjišťovali vliv substrátu s různým podílem strusky, bohaté především na Ni a Cu (plus další kovy: B, Co, Cr, Fe, S, Zn), na kopretinu bílou (*Leucantheum vulgare* L.). Tyto dva kovy – Ni a Cu – jsou známy svojí schopností tvorby komplexů s organickými sloučeninami obsaženými v půdě, což může ovlivnit jejich působení na rostliny v půdě rostoucí (viz kapitola Vliv těžkých kovů na kořeny rostlin).

Interakce těžkých kovů s dostupností minerálních živin se mohou měnit, nejsou jen synergické. Mufarrege et al. (2009) zkoumali odpověď vodní rostliny babelky řezanovité (*Pistia stratiotes* L.) na zvýšenou koncentraci Cr, Ni, Zn – při působení jednotlivých kovů samostatně, dohromady a dohromady spolu s přidavkem P. Nejtoxičtější byl samotný nikl a kombinace všech prvků bez přidaného P – byly zjištěny redukce v biomase i změny anatomických parametrech kořenů, stéle a trachejí metaxylému. Přidaný P zmírnil tyto změny. Zdá se tedy, že P zvyšuje toleranci *P. stratiotes* k působení kovů.

4.1. Vliv těžkých kovů na růst rostlin a objem jejich biomasy

Přítomnost vysokých koncentrací těžkých kovů v půdě redukuje růst rostlin a s tím související nárůst jejich biomasy. Některé kovy však v nižších koncentracích mohou růst i stimulovat.

Pozitivní efekt na růst měla např. nízká koncentrace kadmia. U ozdobnice čínské (*Miscanthus sinensis* L.) při hydroponii bylo zjištěno zlepšení růstu až do koncentrace $4,4\mu\text{M}$ Cd (Scebba et al., 2006). Pozitivní vliv nízké koncentrace kadmia na vyšší produkci biomasy byl zjištěn u silenky dvoudomé (*Silene dioica* L.) (Martinka a Lux, 2004). Se zvyšující se koncentrací prvku produkce biomasy klesá. Současně poměr suché a čerstvé biomasy pozitivně koreluje s nárůstem koncentrace kadmia v hydroponii. Z dlouhodobého hlediska autoři předpokládají, že dané pozitivní efekty nepřetrvají a toxicita kadmia se projeví později. Ryser a Emerson (2007) pozorovali snížený růst u kopretiny bílé (*L. vulgare* L.) jako důsledek působení niklu a mědi. Stejně tak Vaculík et al. (2009) pozorovali inhibici růstu i nárůstu biomasy u kukuřice (*Zea* L.) rostoucí v hydroponii kontaminované kadmiem ($5\mu\text{M}$). Negativní dopad kadmia na růst rostlin lze zmírnit např. přidáním křemíku, který zlepšuje všechny růstové parametry (Vaculík et al., 2009). Snížený růst listů (38%) a kořenů (70%) byl pozorován i u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) rostoucího pod vlivem uranu ($100\mu\text{M}$ po dobu čtyř dnů).

Při srovnání inhibičního vlivu kadmia, mědi a zinku na nárůst biomasy podzemnice olejné (*Arachis hypogaea* L.) bylo zjištěno, že nejsilněji působí kadmium. Rostliny rostoucí v půdě kontaminované 200 mg kg^{-1} Cd, Cu a Zn vykazovaly redukcii biomasy nadzemních částí o 62,2%; 39,8% a 18,4%. V případně biomasy kořenů došlo k redukcii o 56,3%; 15,6% a 34,4% (Shi et al., 2009).

Pro správný růst a vývoj rostlin je nutná dostatečná přítomnost nezbytných živin. Ukazuje se, že těžké kovy mohou negativně ovlivnit jejich příjem a obsah v rostlinách, což má neblahý vliv na jejich vývoj. Das et al. (1997) v souhrnné práci, která se týká toxického účinku kadmia na rostliny, poukazuje na interferenci kadmia s příjmem a transportem dalších prvků a také vody. Se zvyšující se koncentrací kadmia byl zjištěn snižující se obsah Fe, Mg, Ca a K u pšenice (*T. aestivum* L.) (Demchenko a Kalimova 2007). Baryla et al. (2001) zkoumali vliv kadmia na obsah některých základních živin (Fe, Mg, Ni, Zn, N) v listech brukve řepky olejky (*B. napus* L.). Pouze u zinku se projevilo významnější snížení (10%) jeho obsahu ve srovnání s kontrolami. To je způsobeno existencí stejného transporteru pro zinek

i kadmium. U ostatních prvků nebyl zjištěn významnější rozdíl (Baryla et al. 2001). O interakci kadmia a zinku bylo pojednáno již v kapitole 2.2. Akumulace těžkých kovů rostlinami. (Baryla et al. 2001). Pod vlivem uranu byl snížen obsah některých základních prvků (např. Ca, Mn, K, Mg, P, S) v listech huseníčku rolního (*A. thaliana* L.) (Vanhoudt et al., 2008).

Žádný negativní dopad na růst vlivem zinku a kadmia nebyl pozorován u brukve sítinovitě (*B. juncea* L.), hyperakumulátoru právě zinku a kadmia, neprojevila se ani chloróza listů. Při vysoké koncentraci Zn (100 mM) však přesto došlo ke snížení v objemu celkové biomasy rostlin, sušiny a relativnímu obsahu vody. Naopak vlivem kadmia k žádným významným změnám nedošlo. Zdá se tedy, že neexistuje maximální limit koncentrace kadmia pro tuto rostlinu (Sridhar et al., 2005).

4.2. Vliv těžkých kovů na strukturu rostlin

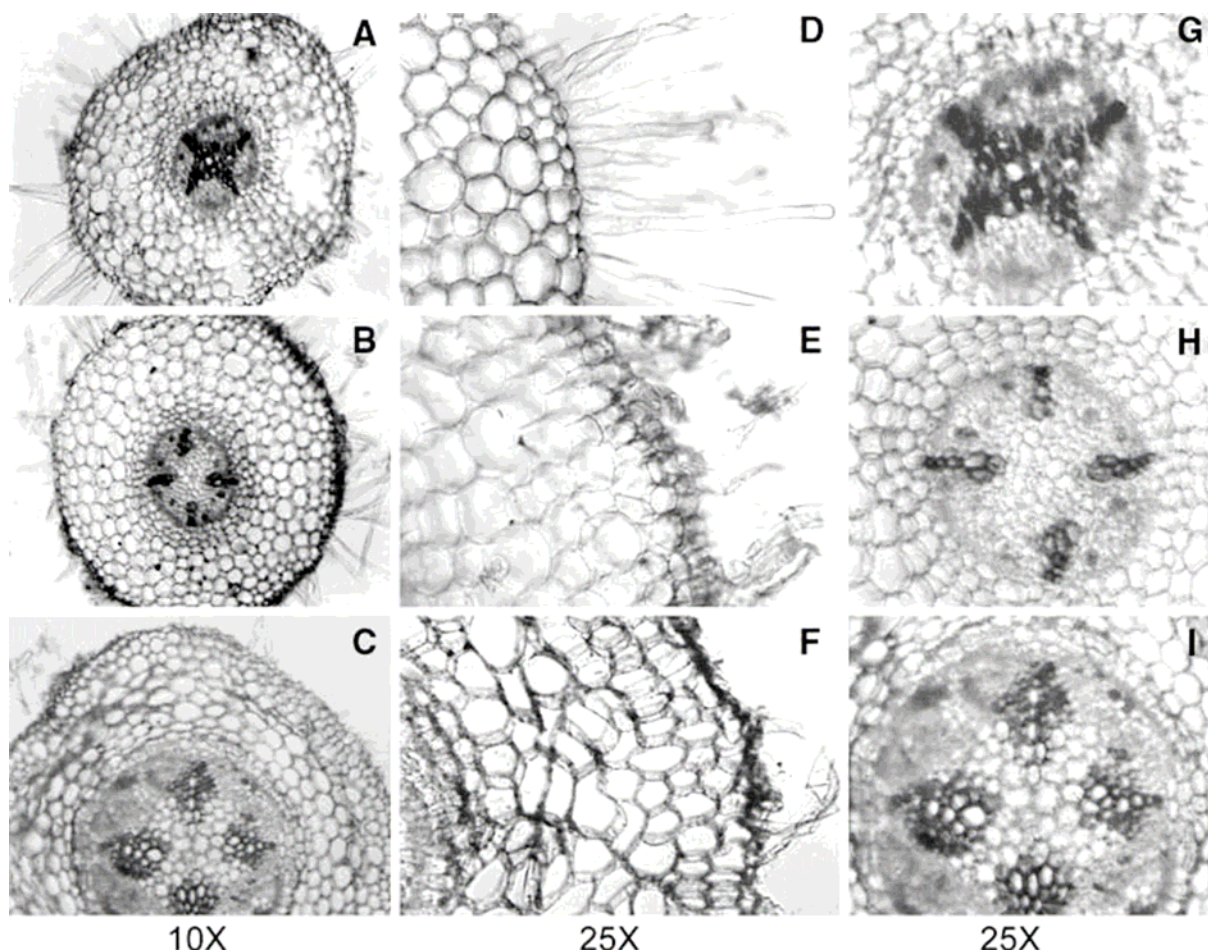
4.2.1. Vliv těžkých kovů na morfologii a anatomii kořenového systému rostlin

Kořen je nejčastější místo bioakumulace těžkých kovů. Jeho vlastnosti jsou přítomností těchto prvků velmi ovlivněny. Těžké kovy mají vliv jak na morfologické uspořádání kořenového systému, tedy zakládání a růst kořenových primordií, tak především na dlouhivý růst a strukturu kořene.

Často bývá pozorováno snížení délky kořene způsobené kontaminací těžkými kovy (např. Ouzounidou et al., 1997, Mufarrege et al. 2010). Toto snížení délky se obvykle zvětšuje spolu se vzrůstající koncentrací těžkého kovu. Např. při kontaminaci fazolu zlatého (*P. aureus* Roxb.) arzenem (10,0 μ M) bylo pozorováno snížení délky kořene o 63 % a při 50,0 μ M As až o 82 % (Singh et al., 2007). S redukcí růstu kořenů souvisí významné snížení rychlosti jejich růstu. Pozorováno bylo např. u třídenní pšenice (*T. aestivum* L.) vystavené vysoké koncentraci NiSO_4 (0,1 mM) – během 48 hodin se průměrná délka kořene kontrolní rostliny zvýšila o 29 mm, zatímco u experimentální rostliny pouze o 12 mm (Demchenko a Kalimova, 2007) Také podle Ouzounidou et al. (1997) má zvýšená koncentrace kadmia vliv na redukcí délky kořenů, ale i nadzemních částí pšenice (*T. aestivum* L.). Při koncentraci 1 mM Cd byl růst kořenů téměř úplně inhibován.

Pro růst kořenů je důležitá koncentrace kovu, při nízkých koncentracích může být růst kořenů i stimulován, např. vlivem mědi. Arduni et al. (1995) zjistili mírné zvýšení prodlužování kořenů při koncentraci 0,1 mM Cu u borovice přimořské (*Pinus pinaster* Ait.). Přesto u příbuzného druhu borovice pinie (*Pinus pinea* L.) nebyl zjištěn významnější vliv. Naopak vysoká koncentrace mědi (5mM Cu) kompletně inhibuje růst kořenů. Přítomnost mědi také ovlivňuje počet postranních kořenů a jejich délku. V přítomnosti 1 mM Cu se o obou výše zmíněných druhů tvořila pouze krátká laterální kořenová primordia. Měď u borovic také ovlivnila tzv. laterální kořenový index (lateral root index), tedy počet postranních kořenů na centimetr délky kořene. Zatímco u *P. pinaster* se index zvýšil, u *P. pinea* naopak došlo k jeho snížení.

Kontaminace půdy niklem a mědí zvýšila hustotu kořenů u kopretiny bílé (*L. vulgare* L.). Zároveň u nich došlo ke změně jejich průměru – u jemných kořenů se průměr zvýšil, u silnějších kořenů se naopak snížil (Ryser a Emerson, 2007). Kořeny ozdobnice čínské (*Miscanthus sinensis* L.) byly po tříměsíčním působení 6,6 μ M kadmia kratší a tlustší. Kořenový systém se stal celkově hustším a kompaktnějším (Scebba et al., 2006). Výrazně kratší a tlustší kořeny byly pozorovány také u rostliny *Karwinskia humboldtiana* rostoucí v hydroponickém roztoku kontaminovaném kadmíem v různých koncentracích (Zelko a Lux, 2004). Při různé míře kontaminace arzenem je patrná částečná nebo úplná absence kořenových vlásků, poničení rhizodermálních buněk i primární kůry kořene. Buňky ztrácejí svůj tvar, jsou zkroucené a rozpadají se. S vyšší koncentrací arzenu stoupá i závažnost poškození buněk. Změny jsou zachyceny na obr. 1 (Singh, 2007).



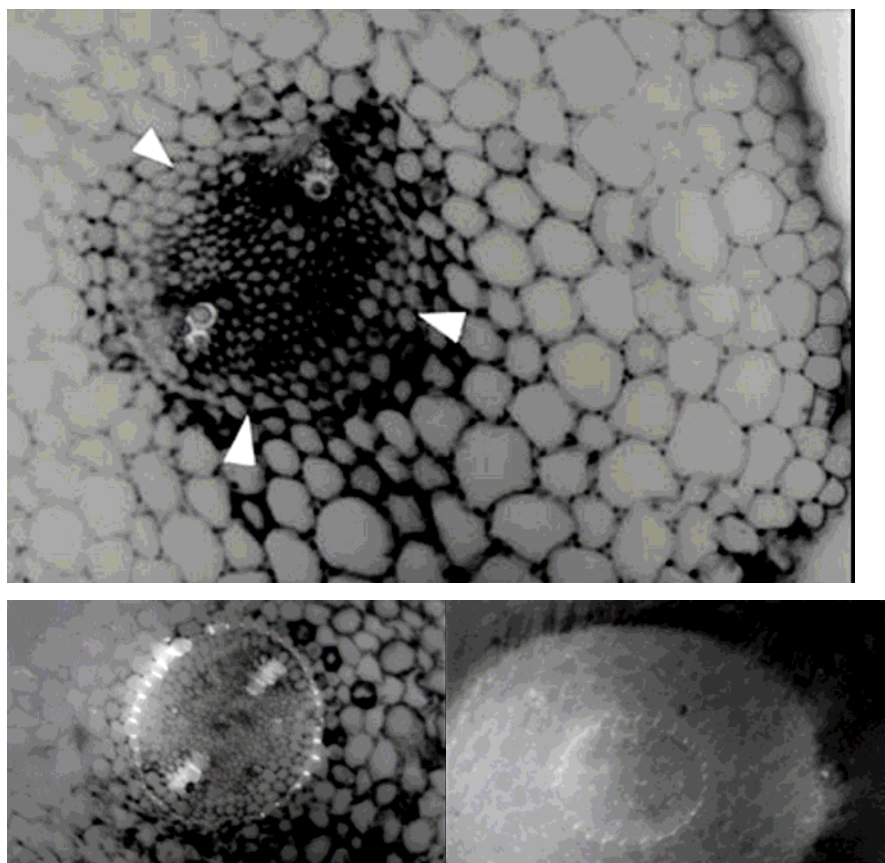
Obr. 1: Příčné řezy kořenem fazolu zlatého (*Phaseolus aureus*) – anatomické změny při vystavení rostlin různým koncentracím arzenu: (A, D, G) 0,0 μM ; (B, E, H) 10,0 μM ; (C, F, I) 50,0 μM . 1. sloupec - příčný řez kořenem; 2. sloupec - epidermální oblast, kořenové vlásky, kortikální buňky; 3. sloupec - detail centrálního stéle Převzato ze Singh et al. (2007)

Seregin a Ivanov (1997) zjistili, že působením kadmia a olova dochází k inhibici růstu hlavního kořene u kukuřice (*Zea mays* L.), formování postranních kořenů však nebylo potlačeno. Zachování normálního zakládání postranních kořenů bylo pravděpodobně dáno tím, že se těžkým kovům se nepodařilo vstoupit do pericyklu, pronikly pouze do první a druhé vrstvy buněk exodermis. Při zabránění inhibice větvení kořenů vlivem těžkých kovů hrají důležitou roli apoplastické bariéry. Tvorba kořenových primordií pokračuje díky přítomnosti Caspariho proužků v endodermis a nepropustností buněčných stěn stéle, jenž dohromady tvoří účinnou bariéru proti vstupu těžkých kovů (Seregin a Ivanov, 1997). Právě apoplastické bariéry mají důležitou úlohu v obraně rostlin proti vstupu toxických látek ze substrátu

do kořenů. Také omezují ztráty kyslíku, což má význam především pro mokřadní rostliny (Soukup et al., 2006).

Apoplastická bariéra v primární kůře kořene je tvořena dvěma strukturami, které slouží rostlinám jako obranný systém. U všech cévnatých rostlin se vyskytuje endodermis. U většiny Angiosperm můžeme nalézt také exodermis. Exodermis je specifický typ hypodermis s přítomností Caspariho proužků, které se vyvíjejí v některých druzích rostlin na základě jejich životních podmínek (Schreiber et al., 1999). Buňky obou struktur mají vyvinuté Caspariho proužky, suberinové lamely a ztlustlé terciální buněčné stěny. Caspariho proužky jsou charakteristické obsahem suberinu a ligninu. Hrají důležitou roli v blokaci průchodu různých iontů apoplastem, těžké kovy nevyjímaje. Jejich další, neméně důležitou úlohou, je zabránění zpětnému toku iontů z apoplastu stéle do apoplastu primární kůry kořene. Na zabránění příjmu iontů do buněk se podílejí suberinové lamely. Narozdíl od Caspariho proužků nejsou formovány ve všech endodermálních buňkách. Pro buňky jsou důležité, ale nejsou pro ně esenciální (Enstone et al., 2003).

Na vývoj Caspariho proužků a suberinové lamely má nesporně vliv přítomnost těžkých kovů v substrátu. Jedná se o adaptivní mechanismus, kterým rostlina může redukovat příjem těžkých kovů. Zřejmé je to při srovnání vývoje Caspariho proužků a suberinové lamely u kořenů rostlin *Karwinskia humboldtiana* rostoucích v hydroponii s vysokou koncentrací kadmia. Na obrázcích z fluorescenčního mikroskopu jsou Caspariho proužky pozorovatelné jako světlé body v radiálních stěnách endodermis. Začátek jejich tvorby u kontrolních rostlin je viditelný v řezu ve vzdálenosti 3-4 mm od vrcholu kořene (obr. 2, nahoře). Ve vzdálenosti 10 mm od apexu jsou již velmi výrazné (obr. 2, vlevo dole). U kořenů rostlin ošetřených kadmíem jejich tvorba začíná v menších vzdálenostech od vrcholu kořenu, počátek jejich vytváření je patrný již ve vzdálenosti 0,5-1 mm od apexu (obr. 2, vpravo dole). Rozvoj Caspariho proužků je u rostlin z kontaminovaných oblastí celkově více rozvinut. Stejně tak je urychlen vývoj suberinových lamel (Zenko a Lux, 2004).



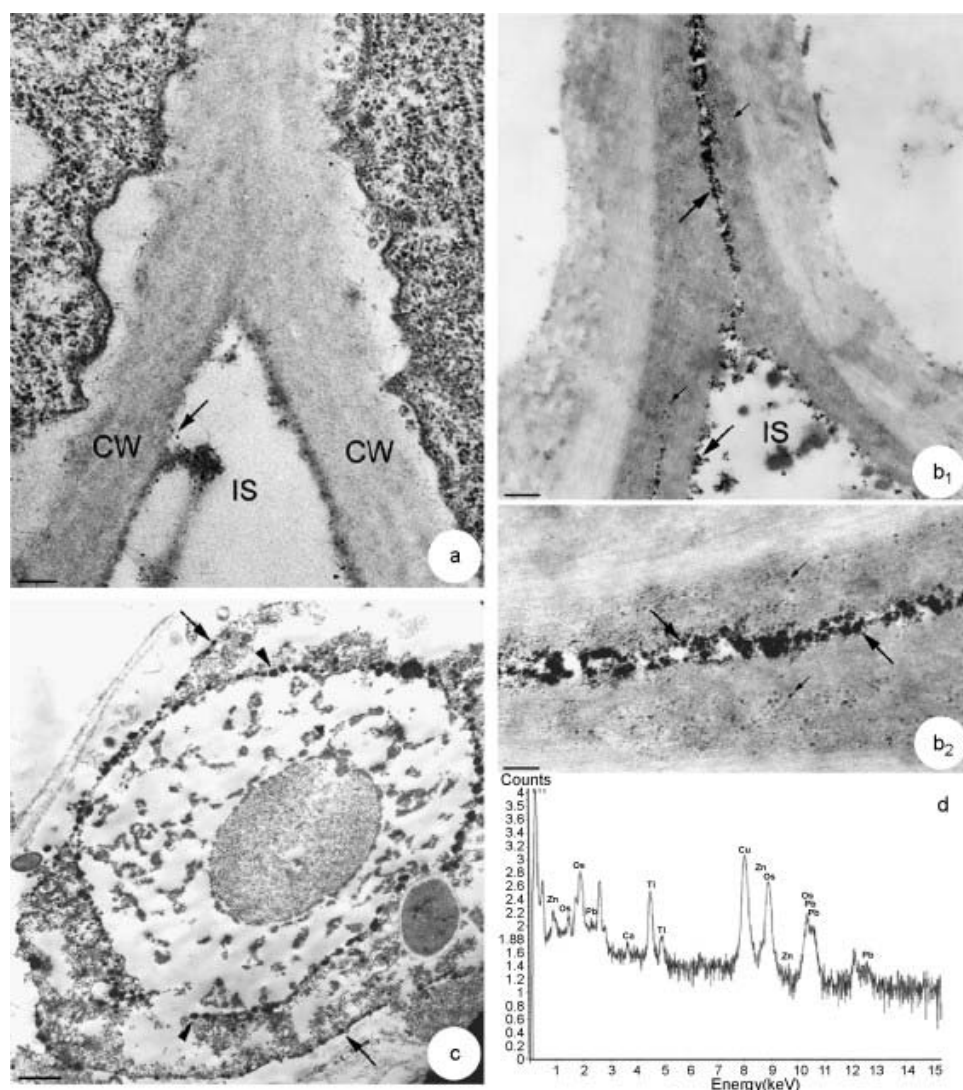
Obr. 2: Příčné řezy kořeny *K. humboldtiana*, barvené pro vizualizaci Caspariho proužků: obr. nahoře: kontrola, 3-4 mm od vrcholu kořene, šipka ukazuje endodermis se začínající tvorbou Caspariho proužků; obr. vlevo dole: kontrola, 10 mm od vrcholu kořene; obr. vpravo dole: řez kořenem rostoucím při kontaminaci kadmíem - 10^{-4} M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$; 0,5 – 1 mm od vrcholu kořene

Měřítko – 50 μM

Převzato ze Zelko a Lux (2004)

Zajímavé je srovnání struktury kořene penízku modravého (*Thlaspi caerulescens*), hyperakumulátoru zinku a kadmia, s penízkem rolním (*Thlaspi arvense*), který se neřadí mezi hyperakumulátory. Na úrovni rhizodermis, primární kůry, stélé i endodermis nejsou pozorovány významnější rozdíly. Pouze u *T. caerulescens* je pozorována velmi výrazná struktura – endodermis obkličuje válec tvořený periendodermální vrstvou buněk, které mají sekundární buněčné stěny bohaté na lignin (Zelko et al., 2008). Toto opět ukazuje na důležitost apopalstických bariér pro případné využití rostlin pro fytoremdiaci, tedy transport do nadzemní části rostlin.

Dalším z mechanismů, kterým se rostlina snaží zabránit nebezpečnému příjmu těžkých kovů a který je patrný ve struktuře kořenů, je ztlouštění buněčné stěny. Bylo pozorováno např. u kořenových buněk bobu obecného (*Viscia faba* L.) rostoucích v půdě zamořené těžkými kovy (Probst et al., 2009). Tento jev je spojen se zvýšenou aktivitou peroxidázy, enzymu katalyzujícího syntesu ligninu (Arduini et al., 1995). Na povrchu, ale i uvnitř buněčných stěn jsou patrné částice kovů. U poškozenějších buněk se tyto částice vyskytovaly i uvnitř buněk, především v okolí plasmatické membrány a jaderného obalu. Akumulace kovů jsou popsány na obr. 3 (Probst et al., 2009).



Obr.3: Akumulace partikulí kovů u rostlin rostoucích v místech zvýšené koncentrace kovů (b₁, b₂, c, d) ve srovnání s kontrolou (a). (a) Pod elektronovým mikroskopem jsou viditelné malé (kompaktní) částice na povrchu buněčné stěny (CW) a v intercelulárních prostorech (IS) v pletivech kořenů kontrolní rostliny. Měřítka = 0,2 μ m. (b₁ and b₂) Distribuce částic kovu v kořenových buňkách *V. faba* rostoucí v hlušině. (b₁) Částice jsou lokalizované

především podél povrchu buněčných stěn a v extracelulárních prostorech. Měřítka = 0,2 μm . (b₂) Při vysokém zvětšení jsou patrné shluky partikulí na povrchu buněčných stěn (šipka) a malé partikule uvnitř buněčných stěn (malé šipky). Měřítka = 0,1 μm . (c) Elektronogram poničených buněk kořene zobrazující partikule na povrchu plasmatické membrány (šipka) a jaderného obalu (ukazatel). Měřítka = 1 μm . (d) Spektrum rentgenové mikroanalýzy z partikulí lokalizovaných na povrchu buněčných stěn kořenů *V. faba* L. rostoucí v hlušině. Pozorována byla maxima Pb, Zn, Ca a C
Převzato z Probst et al. (2009)

4.2.2. Vliv těžkých kovů na morfologii, anatomii a fotosyntetickou aktivitu listů

Působením těžkých kovů dochází k makroskopickým i mikroskopickým změnám na úrovni listů. Podobně jako u kořenů dochází k redukci jejich růstu a k poškození jejich struktury. Následkem toho může být omezena jejich fotosyntetická funkce. To je způsobeno také snížením množství fotosyntetických pigmentů – chlorofylů i karotenoidů. Na sníženém množství chlorofylu se může podílet jednak degradace tylakoidů, tak i inhibice jeho biosyntézy. Snížená fotosyntetická aktivita má za následek menší nárůst biomasy rostlin. Projevem vysokých koncentrací těžkých kovů je redukovaný růst listů. Při zvýšené koncentraci kadmia (5 μM) se projevila redukce délky i šířky 1. a 2. listu kukuřice (*Zea* L.) vystavené zvýšené koncentraci kadmia (5 μM), tím byla také snížena celková plocha listu (Vaculík et al., 2009).

Vlivem působení těžkých kovů na rostlinu dochází často k chlorózám listů. Mechanismy, které je způsobují nejsou zcela jasné. Například kadmium působí na rostliny rozmanitými způsoby. Nepřímo způsobuje poruchy metabolismu, vede k oxidativním poškozením. Možným mechanismem destrukce chlorofylu se zdá být substituce centrálního atomu Mg v molekule chlorofylu kadmiem. Práce zabývající se vlivem kadmia na fotosyntetickou aktivitu rostlin jsou však rozporuplné. Podle některých je kadmium inhibítozem, zvláště fotosystému II, podle jiných světelná fáze fotosyntézy vůbec není citlivá na přítomnost kadmia (Baryl et al. 2001). Nejpravděpodobnější se zdá být, že chlorosy jsou důsledkem nízké hustoty chloroplastů, která je způsobená jejich sníženým počtem a změnami ve velikosti buněk (Bertrand, Poirier 2005). Baryl et al. (2001) zjišťovali vliv kontaminace kadmia (100mg Cd/kg suché půdy) na brkev řepku olejkou (*B. napus*). Podle nich není chlorosa způsobena přímou interakcí kadmia s biosyntézou chlorofylu, ale právě sníženou

hustotou chloroplastů v buňce a změnami v buněčné velikosti – zvýšila se velikost mezofylových buněk. Celkové množství chloroplastů se snížilo o 50%. Mezofylové buňky rostoucí v přítomnosti kadmia obsahovaly průměrně 8 chloroplastů, zatímco buňky kontrolní 12. Efektem působení kadmia tedy jsou větší buňky obsahující méně chloroplastů (Baryla et al. 2001). To pozorovali již např. Klobus a Buczek (1985) u okurek rostoucích v půdě kontaminované těžce kadmii.

Působením těžkých kovů dochází ke změnám velikosti buněk a k jejich narušení. Nejzásadnější změny v ultrastruktuře mezofylových buněk listů jsou patrné na úrovni chloroplastů. Obecně lze říci, že působením těžkých kovů jsou pozorovány změny ve stavbě a vzhledu thylakoidů, jejich organizace je často narušena, mění se obsah chlorofylu. Grana chloroplastů vlivem působení těžkých kovů buď ubývají nebo naopak zduří. Polypeptidové složení membrány thylakoidů je působením stresu vyvolaného těžkými kovy degradováno (Cheng et al., 2003). U bobu obecného (*V. fabia* L.) rostoucího v substrátu bohatém na těžké kovy (kontaminace Pb, Cd, Zn) se projevilo významné zduření thylakoidů a zároveň se snížil jejich počet v granu chloroplastů. Naopak se zvýšil počet plastoglobulů (Probst et al., 2009). Všechny tyto změny vedou ke snížené efektivitě fotosyntézy (Bertrand a Poirier, 2005). Bertrand a Poirier (2005) ve své souhrnné práci uvádějí, že zinek, důležitý esenciální prvek, může hrát významnou úlohu v ochraně chloroplastů a s tím souvisejících fotochemických reakcích. U vodřatky (*Hydrocharis dubia* L.) zbytnují thylakoidy chloroplastů, ale i lumen mitochondrií již při nízkých koncentracích rtuti (Hao et al., 2001; Cheng et al., 2003).

Při vystavení rostlin hrachu setého (*Pisum sativum*) 50 μM CdCl_2 byla pozorována narušení struktury mezofylu listu, kdy se zvětšily buňky mezofylové, zatímco interceluláry se zmenšily. Byla též pozorována vážná narušení struktury chloroplastů (Sandalio et al., 2001). U chloroplastů křenu selského (*Armoracia rusticana*) vystavených působení terbia, těžkého kovu ze skupiny lanthanoidů, se projevily významné změny také především ve struktuře thylakoidů. Byla porušena jejich lamelární struktura, granum thylakoidů se ztenčilo. Narušení bylo patrné i u membrán chloroplastů. Se vzrůstající koncentrací a dobou působení se všechny tyto změny prohloubily (Wang et al., 2009).

Na obrázku 4 je patrné, že u chloroplastů mezofylových buněk ředkve *Raphanus sativus* var. Redondo Vermelho vystavené kontaminaci kadmia (0,25 a 1,0 mM CdCl_2) došlo k mírné reorganizaci a rozkladu thylakoidů a stromatu, jejich systém byl narušen. Chloroplasty rostlin rostoucích při kontaminacích 0,25 nebo 1,0 mM CdCl_2 vykazovaly změny ve svém tvaru. Při kontaminaci 1,0 mM CdCl_2 (ale ne 0,25 mM) došlo ke zduření

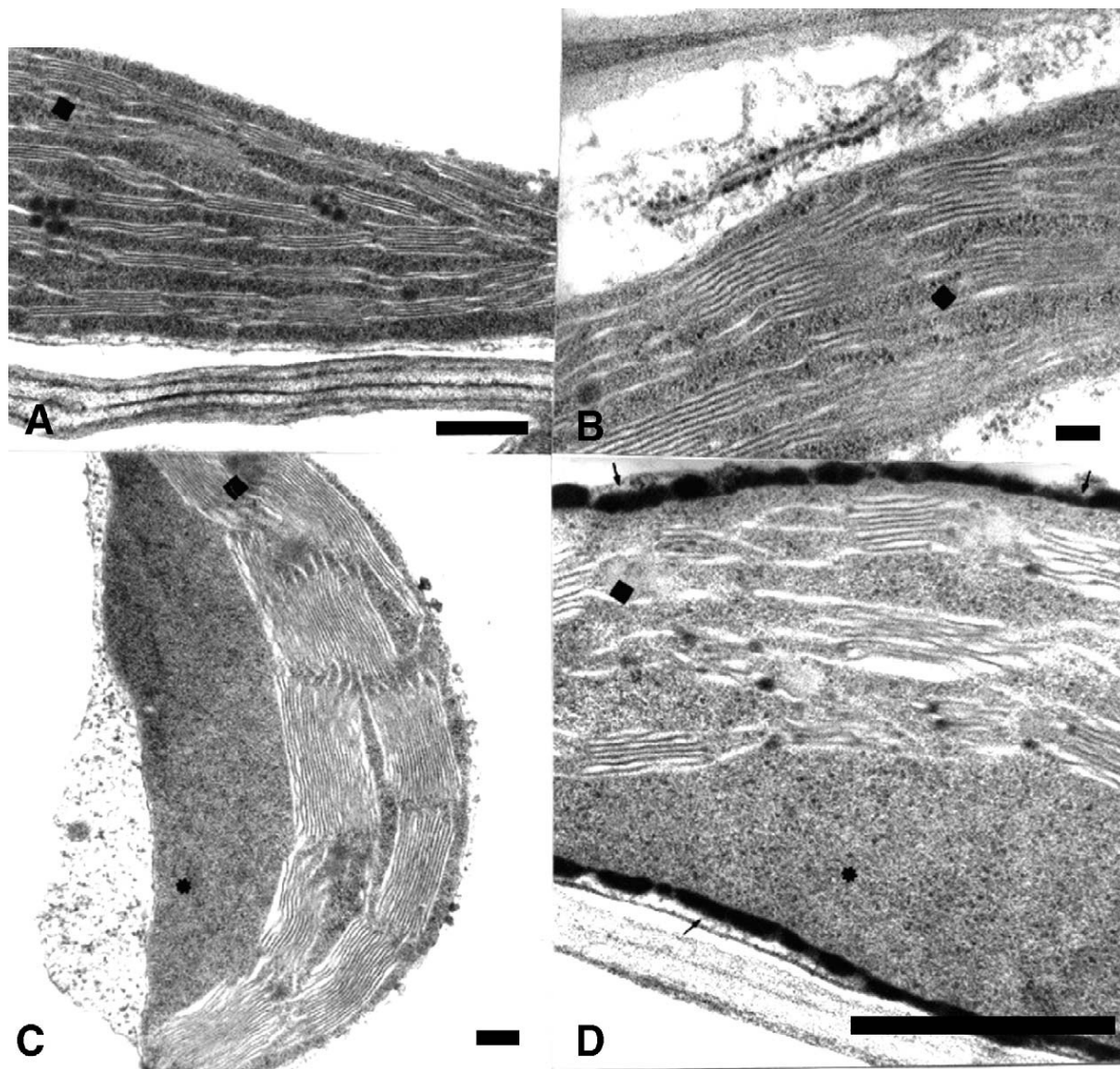
chloroplastů vlivem zvětšeného objemu stromatu i k vlastnímu přemístění stromatu a gran (ale ne 0,25 mM) (Vitória et al. 2006).

Kadmium pravděpodobně způsobuje také předčasnou senescenci listů (Ouzounidou et al., 1997).

Negativní vliv na strukturu listů se projevuje i u hyperakumulátorů kovů, přestože na nich nejsou viditelné známky fytotoxicity. K poškozením dochází např. u sledované brukve sítinovité (*B. juncea*), akumulující velká množství zinku a kadmia. Analýzami listů bylo zjištěno, že při vysokých koncentracích zinku (50 a 100mM) dochází k výrazným změnám v jejich struktuře. Buňky houbového i palisádového parenchymu byly poškozeny a došlo i ke změně jejich tvaru. Zmenšené byly také mezibuněčné prostory. V listech se snížil obsah škrobu, jenž slouží jako zásobní látka. Nižší byl také relativní obsah vody, z důvodu snížené translokace vody mezi kořeny a nadzemními částmi rostlin. Vlivem kadmia k žádným signifikantním změnám ve struktuře nedošlo (Sridhar et al., 2005).

K poničení palisádového i houbového parenchymu došlo i působením rtuti na vodní rostliny *Brasenia schreberi* L. (Li et al., 1998; Cheng et al., 2003; Li et al., 1998).

Působení těžkých kovů má vliv také na hustotu a velikost průduchů listů. Průduchy představují velice důležitou strukturu listů, především zajišťují výměnu plynů (CO_2 a O_2) (Evans et al. 1994; Shi a Cai, 2009). Zvýšená koncentrace kadmia a v půdě způsobila zvýšení hustoty průduchů u podzemnice olejné (*Arachis hypogaea* L.), s rostoucí koncentrací rostla hustota (200; 400 a 800 mg kg^{-1}). Stejný efekt měla měď. V případě zinku hustota nejprve stoupala, ale při vyšší koncentraci naopak mírně klesla. Velikost průduchů byla rozdílná u horní a spodní epidermis listu. Zatímco u horní epidermis listu se délka průduchů se vzrůstající koncentrací prvků snižovala, u horní epidermis bylo zkrácení patrné pouze při kontaminaci mědí a 800 mg kg^{-1} zinku. Kadmium ani nižší koncentrace zinku nezpůsobily žádné výraznější změny (Shi et al., 2009). Obecně působením těžkých kovů dochází k negativním změnám na úrovni průduchů, což může negativně ovlivňovat vodní provoz celé rostliny.



Obr.4: Chloroplasty mezofylových buněk ředkve při kontaminaci CdCl_2 - TEM

(A) kontrola; (B) kontaminace 0,25 mM CdCl_2 ; (C a D) kontaminace 1,0 mM CdCl_2

U chloroplastů ovlivňovaných kadmíem je patrná mírná reorganizace a rozklad tylakoidů a stromatu. Chloroplast (čtvereček); stroma (hvězdička); depozice materiálu (šipka)

Převzato z Vitoria et al. (2006)

5. Závěr

Kontaminace půd a vod těžkými kovy je problém na mnoha místech světa. Rostliny často tvoří prostředníka mezi znečištěným substrátem a organismy. Samy jsou proti působení těžkých kovů odolné díky celé řadě mechanismů. Tato odolnost je druhově velmi specifická. Zvláště přizpůsobené vysokým koncentracím kovů v půdě jsou tzv. hyperakumulátory. Jedná se o rostliny schopné ve svých nadzemních částech akumulovat taková množství kovů, která mnohem převyšují obsah kovů v půdě a v neakumulujících rostlinách. Tuto jejich vlastnost je možné využít při odstraňování kontaminantů z prostředí pomocí metod fytořemediace.

Ve své práci jsem se snažila shrnout současné poznatky o vlivu těžkých kovů na strukturu rostlin. Zaměřila jsem se na ovlivnění anatomických a morfologických vlastností kořenů a listů. Nejstudovanějšími prvky ovlivňujícími vlastnosti rostlin jsou především kadmium, arzen, nikl a další, proto jsou v práci přednostně uváděny příklady strukturálních změn právě v důsledku působení těchto prvků. Některým prvkům však dosud byla věnována velmi malá pozornost. V dostupné literatuře se například téměř nevyskytují informace o vlivu uranu na strukturu rostlin. Přitom kontaminace tímto prvkem jsou velmi rozšířené. Tímto tématem bych se proto ráda zabývala ve své diplomové práci a doufám, že přinese nové, originální poznatky.

6. Seznam použité literatury

1. Adriano, D.C. Trace elements in the terrestrial environment. New York, 1986.
2. Appenroth KJ, Krech K, Keresztes A, Fischer W, Koloczec H. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere*. [Article]. 2010 Jan;78(3):216-23.
3. Arduini I, Godbold DL, Onnis A. Influence of copper on root – growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* ait seedling. *Tree Physiology*. 1995 Jun;15(6):411-5.
4. Assuncao AGL, Schat H, Aarts MGM. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*. 2003 Aug;159(2):351-60.
5. Baryl A, Carrier P, Franck F, Coulomb C, Sahut C, Havaux M. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta*. 2001 Apr;212(5-6):696-709.
6. Behmer ST, Lloyd CM, Raubenheimer D, Stewart-Clark J, Knight J, Leighton RS, et al. Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Functional Ecology*. 2005 Feb;19(1):55-66.
7. Bertrand M, Poirier I. Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica*. 2005;43(3):345-53.
8. BOYD RS, SHAW JJaM, S.N. Nickel hyperaccumulation in *S. Polygaloids* (Brassicaceae) as a defense against pathogens. *American Journal of Botany* 1994. p. p. 294-300.
9. Brooks RR, Lee J, Reeves RD, Jaffré T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* 7: 49–57.
10. Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, et al. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*. [Review]. 1997 Jun;8(3):279-84.
11. Cheng SP. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*. [Review]. 2003;10(4):256-64.
12. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*. [Review]. 2001 Mar;212(4):475-86.
13. Cunningham D. S, Berti W. R, Huang W. J. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*. 1995; 13 (9): 393-397
14. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution*. 1997;98(1):29-36.

15. Demchenko NP, Kalimova IB. Dynamics of Growth, Proliferation and Differentiation of Wheat Root Cells Exposed to a High Nickel Concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2008 Nov;55(6):787-98.
16. Demnerová K. Bioremediační technologie k odstranění polychlorovaných bifenyků ze životního prostředí. Národní implementační plán pro implementaci Stockholmské úmluvy v České republice. 2003: <http://recetox.muni.cz/pops-centrum/index.php?pg=pops--verze-2003>
17. Dushenkov S, Vasudev D, Kapulnik Y, Gleba D, Fleisher D, Ting KC, et al. Removal of Uranium from water using terrestrial plants. *Environmental Science & Technology*. 1997 Dec;31(12):3468-74.
18. Dushenkov V, Kumar P, Motto H, Raskin I. Rhizofiltration – the use of plants to remove heavy – metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology*. [Article]. 1995 May;29(5):1239-45.
19. Enstone DE, Peterson CA, Ma FS. Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*. [Review]. 2002 Dec;21(4):335-51.
20. Evans JR, Voncaemmerer S, Setchell BA, Hudson GS. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic Tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1994;21(4):475-95.
21. Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 2005;32(6):481-94.
22. Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. [Review]. 2002 Jan;53(366):1-11.
23. Hao H, Shi G, Du K et al. Toxic effect of Hg²⁺ on physiology and ultrastructure of *Hydrocharis dubia* J. 2001 *Lake Science* 13 (2) 163-168
24. Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Kochian LV. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiologia Plantarum*. 2002 Sep;116(1):73-8.
25. Jabeen R, Ahmad A, Iqbal M. Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms. *Botanical Review*. 2009 Dec;75(4):339-64.
26. James BR. The challenge of remediating chromium-contaminated soil. *Environmental Science & Technology*. [Article]. 1996 Jun;30(6):A248-A51.
27. Kay SH, Haller WTaG, L.A. Effect of heavy metals on water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms]. 1984. 117-128.

28. Klobus G, Buczek J. Chlorophyll content, cells and chloroplast number and cadmium distribution Cd – treated cucumber plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. [Article]. 1985;7(3):139-47.
29. Kučerová P, Macková M, Macek T. Perspektivy fytořediacie při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chemické listy* 93. 1999. 19-26
30. Kummerova M, Zezulka S, Kral'ova K, Masarovicova E. Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. *Biologia Plantarum*. 2010 Jun;54(2):308-14.
31. Macková M. Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí. 2005. www.phytosanitary.cz
32. Martinka M, Lux A. Response of roots of three populations of *Silene dioica* to cadmium treatment. *Biologia*. [Proceedings Paper]. 2004;59:185-9.
33. Minguzzi C, Vergnano O. Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii* Desv. *Memorie Societa Toscana Di Scienze Naturali Serie A* 55: 49 - 77
34. MO SC, CHOI DSaR, J.W. Uptake of mercury from aqueous solution by duckweed: the effect of pH, copper, and humic acid. 1989. p. p. 135-46.
35. Mufarrege MM, Hadad HR, Maine MA. Response of *Pistia stratiotes* to Heavy Metals (Cr, Ni, and Zn) and Phosphorous. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010 Jan;58(1):53-61.
36. Munzuroglu O, Geckil H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and Coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2002 Aug;43(2):203-13.
37. Ouzounidou G, Moustakas M, Eleftheriou EP. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L) leaves. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. [Article]. 1997 Feb;32(2):154-60.
38. Prasad MNV. Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: Hype for commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology*. [Review]. 2003 Sep-Oct;50(5):686-700.
39. Prasad MNV, Freitas HMD. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. [Review]. 2003 Dec;6(3):285-321.
40. Probst A, Liu HY, Fanjul M, Liao B, Hollande E. Response of *Vicia faba* L. to metal toxicity on mine tailing substrate: Geochemical and morphological changes in leaf and root. *Environmental and Experimental Botany*. [Article]. 2009 May;66(2):297-308.

41. Robinson BH, Chiarucci A, Brooks RR, Petit D, Kirkman JH, Gregg PEH, et al. The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration*. 1997 Jun;59(2):75-86.
42. Rugh CL, Wilde HD, Stack NM, Thompson DM, Summers AO, Meagher RB. 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*. 1996 Apr;93(8):3182-7.
43. Ryser P, Emerson P. Growth, root and leaf structure, and biomass allocation in *Leucanthemum vulgare* Lam. (Asteraceae) as influenced by heavy-metal-containing slag. *Plant and Soil*. 2007 Dec;301(1-2):315-24.
44. Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 2001 Nov;52(364):2115-26.
45. Sawidis T. Effect of cadmium on pollen germination and tube growth in *Lilium longiflorum* and *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*. [Article]. 2008 Sep;233(1-2):95-106.
46. Scebba F, Arduini I, Ercoli L, Sebastiani L. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. *Biologia Plantarum*. 2006 Dec;50(4):688-92.
47. Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, Wolfe NL, Carreira LH. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology*. [Article]. 1995 Jul;29(7):A318-A23.
48. Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany*. [Review]. 1999 Aug;50(337):1267-80.
49. Schutzendubel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. [Proceedings Paper]. 2002 May;53(372):1351-65.
50. Schwartz C, Gerard E, Perronnet K, Morel JL. Measurement of in situ phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a former smelter site. *Science of the Total Environment*. 2001 Nov;279(1-3):215-21.
51. Seregin IV, Ivanov VB. Is the endodermal barrier the only factor preventing the inhibition of root branching by heavy metal salts? *Russian Journal of Plant Physiology*. [Article]. 1997 Nov-Dec;44(6):797-800.
52. Seregin I, Kozhevnikova A. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2008 JAN 2008:1-22.
53. Shah K, Nongkynrih JM. Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum*. 2007 Dec;51(4):618-34.

54. Sharma RK, Agrawal M. Single and combined effects of cadmium and zinc on carrots: Uptake and bioaccumulation. *Journal of Plant Nutrition*. 2006 Oct;29(10):1791-804.
55. Shi GR, Cai QS. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. [Article]. 2009 Nov;67(1):112-7.
56. Shi GR, Cai QS. Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to zinc stress. *Biologia Plantarum*. [Article]. 2009 Jun;53(2):391-4.
57. Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*. 2007 Sep;53(1):65-73.
58. Soudek. Fytoremediace a možnosti zvýšení její účinnosti. In: Petrová Bo, Kotyza, Vaněk, editor. *Chem. listy* 1022008. p. 346–52.
59. Soudek P, Vichova L, Valenova S, Podlipna R, Mala J, Vanek T. Arsenic and its uptake by plants. *Chemicke Listy*. 2006;100(5):323-9.
60. Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubova O. Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist*. 2007;173(2):264-78.
61. Sridhar BBM, Diehl SV, Han FX, Monts DL, Su Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental and Experimental Botany*. [Article]. 2005 Sep;54(2):131-41.
62. Stojanovic M, Stevanovic D, Iles D, Grubisic M, Milojkovic J. The Effect of the Uranium Content in the Tailings on Some Cultivated Plants. *Water Air and Soil Pollution*. 2009 Jun;200(1-4):101-8.
63. Tlustoš P, Szaková J, Hrubý J, Hartman I, Najmanová, Nedělník J, Pavlíková D, Batysta M. Removal of As, Cd, Pb a Zn from contaminated soil by high biomass producing plants Plant soil. *Environ*. 2006 (9): 413 - 423
64. Tome FV, Rodriguez PB, Lozano JC. Elimination of natural uranium and Ra-226 from contaminated waters by rhizofiltration using *Helianthus annuus* L. *Science of the Total Environment*. 2008 Apr;393(2-3):351-7.
65. Vaculik M, Lux A, Luxova M, Tanimoto E, Lichtscheidl I. Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environmental and Experimental Botany*. 2009 Nov;67(1):52-8.
66. Vanhoudt N, Vandenhove H, Smeets K, Remans T, Van Hees M, Wannijn J, et al. Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. [Article]. 2008 Nov;46(11):987-96.

67. Vitoria AP, Da Cunha M, Azevedo RA. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 2006 Dec;58(1-3):47-52.
68. Wang LH, Zhou Q, Huang XH. Photosynthetic responses to heavy metal terbium stress in horseradish leaves. *Chemosphere*. 2009 Nov;77(7):1019-25.
69. Zelko I, Lux A. Effect of cadmium on *Karwinskia humboldtiana* roots. *Biologia*. 2004;59:205-9.
70. Zelko I, Lux A, Czibula K. Difference in the root structure of hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. *International Journal of Environment and Pollution*. 2008;33(2-3):123-32.

