Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Daniela Krejčová

Faktory ovlivňující příjem a distribuci uranu v rostlinách

Factors affecting uptake and distribution of uranium in plants

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Konzultanti: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D

RNDr. Petr Soudek, Ph. D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

Podpis

Poděkování

Chtěla bych moc poděkovat mojí školitelce Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D. za obrovskou podporu, věcné připomínky a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultatnce prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D, za trpělivost, mnoho podnětných rad a připomínek, které mi velice pomohly. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat mojí rodině a přátelům, kteří ochotně naslouchali a podrželi mě, kdykoliv to bylo třeba.

Abstrakt

Uran je radionuklid, který se v malém množství přirozeně vyskytuje v zemské kůře. V těchto koncentracích není příliš nebezpečný, ale jeho koncentrace se kvůli antropogenní činnosti zvyšuje a dá se očekávat, že i v budoucnosti bude jeho množství narůstat. Proto je nutné zkoumat možnosti, jak takovouto kontaminaci co nejšetrněji a zároveň efektivně odstranit. Vhodným řešením by mohla být fytoremediace, ale tato metoda je v případě kontaminace uranem relativně na začátku. Proto je třeba studovat vliv uranu na rostliny a zjistit, nakolik jsou vhodné pro fytoremediaci uranem kontaminovaných areálů. Fytoremediační metody jsou založené na schopnosti rostlin přijímat a akumulovat dané polutanty. Nejzásadnější faktory ovlivňující příjem uranu rostlinou se dají v zásadě rozdělit do čtyř skupin: druh rostliny, oxidační stav uranu, pH média nebo substrátu a ligand, který je na uran navázán (Mitchell, 2013). S tím úzce souvisí i transport uranu do nadzemních částí rostliny. Rostliny se musí s přijatým uranem vypořádat; kromě radiologického rizika vyplývajícího z vlastností radioizotopu, je uran zároveň i těžký kov. Pro rostliny je výrazně závažnější chemická toxicita uranu způsobující mimo jiné oxidativní stres, než radioaktivita uranu. Informace o působení uranu na rostliny jsou velmi důležité pro další rozvoj fytoremediačních technik uranem znečištěných ploch. Závěrem jsou pak diskutovány možnosti využití rostlin pro fytoremediační techniky při kontaminaci prostředí zvýšenou koncentrací uranu.

Klíčová slova:

akumulace uranu, antioxidační enzymy, fytoremediace, fyziologické odezvy na působení uranu, oxidativní stres, příjem a translokace uranu, rostliny, uran

Abstract

Uranium is a radionuclide, which naturally occurs in Earth's soil in rather an insignificant amount. It is not very dangerous in such small concentration; however, this concentration is rising due to anthropogenic activity, therefore an estimation of its increase is at hand. It is necessary to research possibilities of not only effective, but also ecological extermination of this contamination. Phytoremediation could be an appropriate solution, but this method is still in its beginning stages when it comes to uranium contaminations. That's why we need to study influences of uranium on plants and find out to what extent are they suitable for phytoremediation of areas contaminated by uranium. Phytoremediation methods are based on the abilities of plants to receive and accumulate certain pollutants. The factors that influence the amount of uranium received by a plant can be divided into four groups: plant species, uranium's oxidation levels, pH of of the medium or the substrate and ligand, which is attached to the uranium (Mitchell, 2013). Transportation of uranium to the aboveground part of the plant is also a factor here. Plants need to deal with the accepted uranium; aside from the radiological risks resulting from the characteristics of radioisotope, uranium is also a heavy metal. Chemical toxicity of uranium, which can cause oxidation stress among other symptoms, is much more significant for the plants this thesis is the discussion of plant's utilization for phytoremediation technics for areas contaminated by uranium.

Keywords:

Uran accumulation, antioxidative enzymes, phytoremediation, physiological response to the action of uranium, oxidative stress, uptake and translocation of uranium by plants, uranium

Obsah

Abstrakt iv
Abstract v
Obsah vi
Seznam použitých zkratek vii
1 Obecný úvod 1
1 Fytoremediace 3
2 Příjem uranu rostlinou a faktory jej ovlivňující 5
2.1 Faktory ovlivňující příjem uranu 6
2.1.1 Vazba uranu na anorganické sloučeniny 6
2.1.2 Vazba uranu na nízkomolekulární organické kyseliny 8
2.2 pH 11
3 Faktory ovlivňující translokaci uranu do prýtu 12
3.1 Metody studia translokace uranu 12
3.2 Faktory ovlivňující translokaci 13
4 Fyziologické účinky uranu na rostliny 14
4.1 Vliv na růst 14
4.2 Oxidativní stres působením uranu 17
4.2.1 Metody studia zhášení volných radikálů 17
4.2.2 Enzymatické cesta zhášení volných radikálů 17
4.3 Fotosyntéza 20
5 Využití poznatků o mechanismech příjmu a translokace uranu v rostlinách pro využití ve fytoremediačních technikách 21
6 Závěr 22
7 Seznam zdrojů a použité literatury: 25
7.1 Literatura 25
7.2 Internetové zdroje 27

Seznam použitých zkratek

- AAS – „atomic absorption spectrometry“; atomová absorpční spektrometrie
- APX1 – askorbát peroxidáza 1
- CAT- kataláza
- CAT1 – kataláza 1
- CAT2 – kataláza 2
- CSD1 – cytoplasmatická Co/Zn superoxid dismutáza
- CSD2 – plastidová cytoplasmatická Co/Zn superoxid dismutáza
- EDDS – S,S-ethylendiamin dijantarová kyselina
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyseliny
- HPLC – „High Performance Liquid Chromatography“; vysokotlaká kapalinová chromatografie
- ICP-AES – „inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry“; atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem
- ICP-MS – „inductively cpupled plasma mass spectrometry“; hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
- ICP-OES – „inductively coupled plasma optical emission spectrometry“; optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
- IMAC – „immobilized metal ion affinity chromatography“; Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech
- iP – N^6-isopentenyladenin
- NADPH oxigenáza - nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxigenáza
- PIXE – „particle induced X-ray emission“; analýza částicově indukované rentgenového záření
- PX – peroxidáza
- RBOH oxigenáza – „respiratory burst oxydase homolog“; isoforma NADPH oxigenázy typická pro oxidativní vzplanutí
- ROS – „reactive oxygen species“; reaktivní formy kyslíku
- SFD1 – plastidická Fe superoxid dismutáza
- SOD – superoxid dismutáza
- TEM – „transmission electron microscopy“; transmisní elektronová mikroskopie
- TEM-EDX – „transmission electron microscopy with energy dispersive X-Ray analysis“; transmisní elektronová mikroskopie s energeticky-disperzní analýzu rentgenového záření

- U-P komplexy – urano-fosfátové komplexy
- XAS – „X-ray absorption spectroscopy“; spektroskopie absorpce rentgenového záření

1 Obecný úvod

Radionuklidy se sice ve velice nízkých koncentracích ale přirozeně nachází prakticky všude po celém světě a projevují se na přirozeném radioaktivním pozadí. Ve stopových koncentracích nejsou nebezpečné, ale lidskou činností se jejich koncentrace na povrchu zvyšuje, ať už kvůli těžbě uranových rud, provozu jaderných elektráren, testování jaderních zbraní, jaderných havárií, ale i použití fosfátových hnojiv, spalování uhlí (Petrova et al., 2013), nebo při vulkanické činnosti (Gavrilescu et al., 2009). To představuje velké ekologické riziko. Radionuklidy, jakožto těžké kovy, jsou toxické a mohou způsobovat velké problémy s oxidativním stresem a mutagenními účinky nejen organismu, který je přijme, ale mohou se dál šířit potravním řetězcem. Rostliny jsou primární producenti, stojí tedy úplně na začátku potravního řetězce. Když rostliny přijmou uran, pohybuje se pak potravním řetězcem dál, zasahuje mnohem větší rádius a je nebezpečí, že se jeho nuklidy dostanou až k nám, k lidem. Například obilniny a luštěniny uran přijímají velmi ochotně – kukuřice a fazole patří mezi rostliny přirozeně nejsnadněji přijímající uran (Singh, 1997). Dalším problémem je i rozpustnost látek, v nichž jsou radionuklidy obsaženy, ve vodě, neboť právě díky tomu se mohou snadno šířit nejen povrchovými toky a kontaminovat další území.

Protože k antropogenním kontaminacím docházelo a bohužel kvůli nezodpovědnému zacházení s radionuklidy stále dochází, je třeba se zaměřit na co nejšetrnější a zároveň účinnou dekontaminaci lidmi kontaminovaných areálů. Jednou z šetrných metod je fytoremediace, která byla definována jako: *„využití zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění či transformaci kontaminantů z životního prostředí“* (Soudek et al., 2008). Fytoremediace je metoda využívající schopnosti rostlin přijímat z okolního prostředí nejen látky, které přímo potřebují pro svůj růst, ale i další látky, včetně toxinů, radionuklidů a dalších, které pak hromadí ve svých orgánech. To se dá využít pro čištění zeminy a povrchových i podzemních vod.

Uran, na který je převážně zaměřená tato práce, se v přírodě vyskytuje v drtivé většině (v 99,27%) jako izotop ^{238}U (Vanhoudt et al., 2008; Tome et al., 2009; Gavrilescu et al., 2009) v přibližné průměrné koncentraci 3 mg/kg (Misson et al., 2009, Saenen et al., 2013; Talliez et al., 2013). Díky jeho velké reaktivitě ho ale jako čistý kov v přírodě nenajdeme. Ochotně reaguje za tvorby oxidů (například smolinec neboli uraninit – oxid uraničitý – UO_2), fluoridů, karbidů, dusičnanů, chloridů či acetátů. V půdách se uran ve formě uranylového

kationtu komplexuje s fosfáty, jíly a organickými sloučeninami, ve vodě o pH nižším než 4,9 ho pak najdeme převážně ve formě uranylového iontu (UO_2^{2+}) a při pH vyšším než 7 ve formě rozpustných uhličitanových komplexů $(UO_2)_2CO_3(OH)^{3-}$, UO_2CO_3, $UO_2(CO_3)_2^{2-}$, $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ a $(UO_2)_3(CO_3)_6^{6-}$ (Petrova et al., 2013).

Vnější kontaminace uranem, jakožto radionuklidem s velmi dlouhým poločasem rozpadu (přibližně 4,5 miliardy let), nízkou specifickou aktivitou (1.24×10^4 Bq g^{-1}) a emisi α-částic, které jsou velice snadno odstínitelné, není pro živočichy příliš nebezpečná, nepřekročí-li záření určitou mez. Pokud ale dojde ke vnitřní kontaminaci, například vdechnutím nebo pozřením uranu, může dojít při vyšších koncentracích k vážným zdravotním problémům – karcinomy, poškození plic, selhání jater, selhání ledvin, mozku, srdce, smrt… (Gavrilescu et al., 2009). Navíc ve vodě rozpustné uranové sloučeniny mohou do jisté míry procházet pokožkou (http://web.ead.anl.gov/uranium/guide/ucompound/health/index.cfm). Další nebezpečnou vlastností uranu je jeho charakter těžkého kovu, kdy v organizmech způsobuje uvolňování kyslíkových radikálů a s nimi související oxidativní stres. Tato vlastnost uranu je pro rostliny nejzávažnější.

Kromě esenciálních prvků, pro rostlinu nezbytných, jsou rostliny schopny přijímat i řadu neesenciálních, či dokonce pro samotnou rostlinu toxických prvků. Mezi tyto prvky patří i uran. Protože pro uran nebyla v rostlinách nalezena žádná biochemická funkce, což je jedno ze tří kritérií esenciality prvku, byl charakterizován jako neesenciální (Horemanset al., 2015). Zároveň je sám o sobě pro rostlinu toxický, takže jeho přijetím nic nezískává, ale naopak se musí vyrovnat s důsledky jeho přijetí.

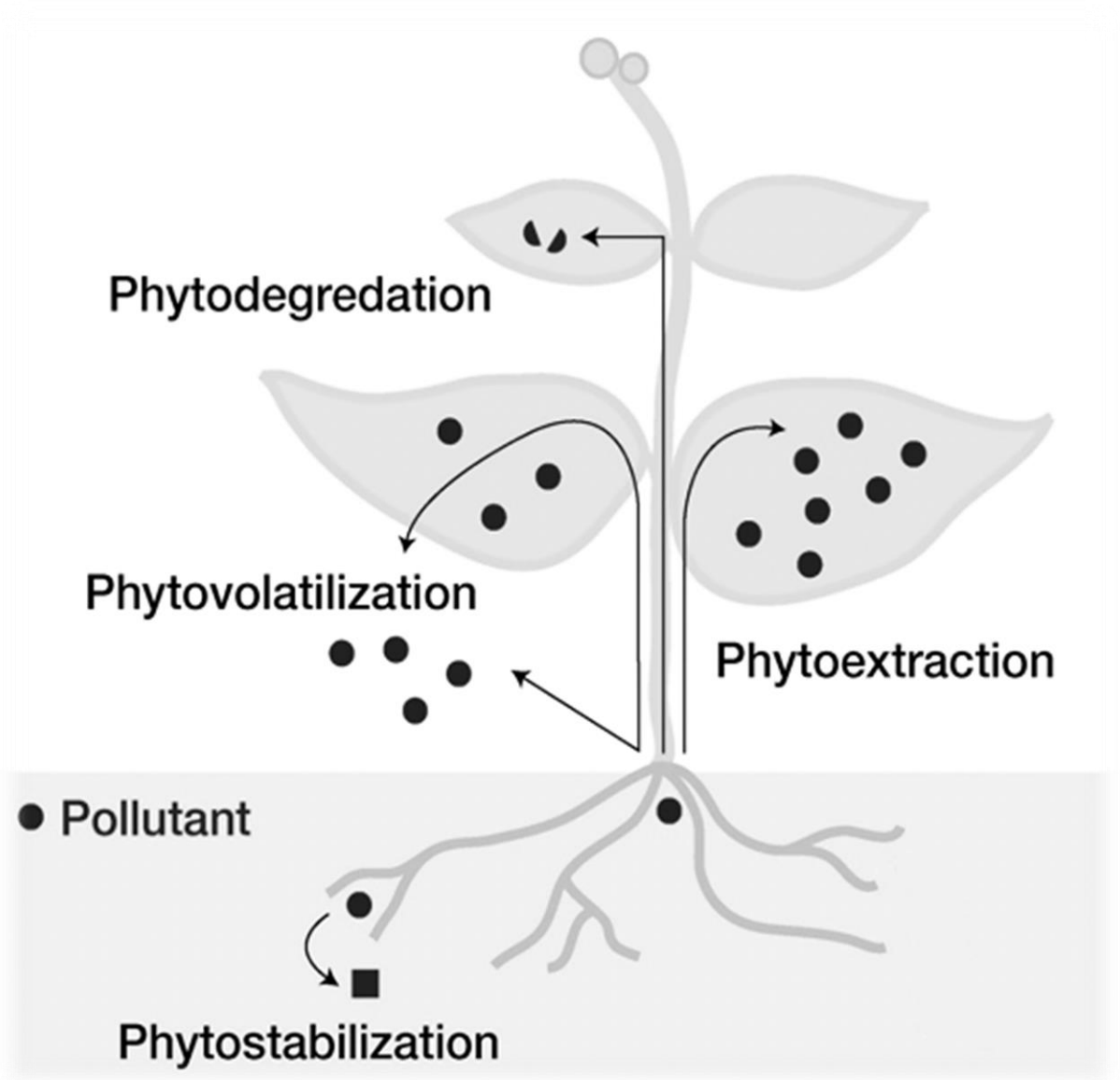
Cílem této práce je shrnout dosud známé informace o působení uranu na rostliny a jak by se těchto znalostí dalo využít při fytoremediaci uranem kontaminovaných ploch.

1 Fytoremediace

Fytoremediace je šetrný způsob pro odstraňování kontaminantů z životního prostředí či jejich transformaci do méně toxických nebo netoxických forem za využití zelených rostlin a mikroorganismů s nimi spojenými. Jako metoda má mnoho výhod, ale i nevýhod. Mezi výhody například patří: možnost aplikovat *in situ*, kdy není po celou dobu trvání potřeba lidský personál, je levnější, půda se dá po proběhnutí metody dále využívat, fytoremediace je dobře přijímána veřejností. Naproti tomu je nevýhodou například dlouhé trvání (roky až dekády), i to že každé znečištěné místo a samotný polutant není pro fytoremediaci vhodný, možnost šíření polutantu potravním řetězcem, omezený dosah kořenové zóny a tím i samotné fytoremediace, absence ‚ideálních' rostlin - hyperakumulátory s velkou tolerancí primárně translokující daný polutant do prýtu (Soudek et al., 2008). Je také třeba počítat s tím, že je rostlina živá: vyžaduje dostatek vody, živin i vzduchu pro kořeny, zároveň jsou její meze tolerance pro pH, strukturu půdy, salinitu i samotné znečištění omezené (Cunningham et al., 1995). Zároveň je metoda v relativně na začátku, takže chybí přesné kalkulace finančních nákladů jak na metodu samotnou, tak na vypořádání se se sklizenými rostlinami.

Podle procesů, jakými se rostlina vypořádá s polutantem, se fytoremediační metody dají rozdělit na: fytoextrakci, fytodegradaci, fytostabilizaci a fytovolatilizaci – viz obrázek 1 (Chaney et al., 1997; Soudek et al., 2008).

Fytodegradace je metoda založená na degradaci polutantu na neškodné nebo méně škodlivé produkty. To může probíhat po ab- či adsorpci polutantu rostlinou, nebo exsudací organických látek rostlinou, které polutant degradují. Fytostabilizace využívá především kořenového systému rostliny, který stabilizuje substrát a zabraňuje vodní i větrné erozi. Zároveň je na sebe schopný vázat určité množství polutantů, díky čemuž je zabráněno jejich dalšímu šíření. Při fytovolatilizaci dochází k absorbování polutantu rostlinou z půdy, jeho následnému převodu na plynnou těkavou formu a transpiraci do ovzduší. Tato metoda sice odstraní polutant z půdy, ale pouze jej přenese do vzduchu, což by bylo u uranu více než kontraproduktivní. Vzduchem by se těkavé sloučeniny obsahující uran mohly snadno šířit dál a znečišťovat další místa, navíc nejvíce škod napáchá v živočiších právě, kdy je vdechnut. Pro fytoremediaci uranem znečištěných stanovišť uranu je nejvýhodnější metodou fytoextrakce, při které je prvek rostlinou extrahován z půdy a naakumulován uvnitř rostliny, která je posléze sklizena. Problémem této metody je ale absence ideálního hyperakumulátoru, tedy rostliny



Obrázek 1: Phytodegradace – polutant je přijat rostlinou a degradován; Phytoextrakce – polutant je přijat rostlinou a akumulován v ní; Phytostablizace – dochází k vazbě polutantu a zabránění jeho dalšímu šíření; Phytovolatilizace – produkt je přijat rostlinou, přeměněn na plynnou těkavou fromu a vytranspirován.
(převzato a upraveno z Pilon-Smits, 2005)

s vysokou schopností přijímat a akumulovat uran převážně v prýtu (Chaney et al., 1997). Obecně rostliny uran výrazně snadněji přijímají při nižších pH, to ale zamezuje transportu do prýtu, což výrazně znesnadňuje sklizení rostlin, neboť aby byla fytoremediace v tomto případě účinná, je nutno rostlinu ze zeminy dostat celou, tedy i kořeny. Komplikací je výskyt anorganického fosfátu v půdě, který s uranem ochotně sráží za tvory ve vodě těžce rozpustných komplexů, z kterých již rostliny ani uran ani fosfát nejsou schopné získat. To značně snižuje účinnost fytoremediace půd bohatých na fosfát kontaminovaných uranem. Druhotně je navíc vytvářeno prostředí fosfátové deficience. Dalším problémem je omezená odolnost rostlin vůči samotnému přijímanému prvku (Cunningham et al., 1995). Při příliš

vysokých koncentracích uranu dochází k příliš velkému oxidačnímu stresu, který rostlinu nakonec zahubí.

Při honbě za vhodným hyperakumulátorem bylo zkoumáno mnoho rostlinných druhů, například slunečnice (*Helianthus annuus L.*), kukuřice (*Zea mays L.),* fazole, brukev sítinovitá, jílek, řepka olejka, tabák (*Nicotiana tabacum L.*)… Prozatím se jako nejlepší hyerakumulátor ukazuje *N. tabacum var. Burley*, která dokázala do listů natranslokovat uran v přibližně 60 krát vyšší koncentraci než ostatní sledované druhy rostoucí v podobných podmínkách (Stojanovic et al., 2012).

2 Příjem uranu rostlinou a faktory jej ovlivňující

Rostliny pro svůj život potřebují mnoho anorganických prvků. Podle kritérií esenciality prvku (viz box 1) je dělíme na esenciální a neesenciální. Podle zastoupení esenciálních prvků v sušině rostliny pak esenciální prvky dále dělíme na makroelementy (N, P, K, Ca, Mg, S; zastoupení větší než 1g/1kg sušiny), jejichž dostatek je pro život rostlin limitní, a mikroelementy (Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, B, Mo; zastoupení menší než 0,1 g/1 kg sušiny). Rostliny je přijímají převážně kořeny, a pokud nějaký makroelement či mikroelement rostlině schází, nebo je naopak v přebytku, specificky se to projeví na jejím růstu či vývoji. Projevy těchto stavů se liší podle druhu a odolnosti dané rostliny i podle míry nedostatku či přebytku daného prvku. Jak už bylo výše zmíněno, rostliny jsou schopné přijímat kromě esenciálních prvků i řadu neesenciálních. Mnohé z neesenciálních prvků rostliny dále využívají a jsou jim prospěšné, těm pak říkáme prvky benefiční. Některé prvky ale prospěšné nejsou, mohou dokonce škodit. Do této kategorie patří uran, který je pro rostliny toxický stejně jako řada dalších těžkých kovů, jako jsou Cd, Hg, Pb, atd.

BOX 1: Kritéria esenciality prvku:

Prvek je esenciální, jestliže:
1) při jeho absenci nebo nedostatku rostlina není schopná dokončit životní cyklus;
2) při jeho nedostatku dochází ke specifické deficienci, která může být kompenzována pouze dodáním daného prvku;
3) je nezbytný pro minerální výživu
(Arnon, D.I. & Stout, P.R., 1939)

Dle mně dostupných informací dosud nebyly identifikovány transportéry pro příjem uranu. Je ale zřejmé, že protože je uran těžký kov, musí nějaký transportér existovat. Nemyslím si, že by se dala v případě uranu očekávat prostá difuze, nebo příjem kanály.

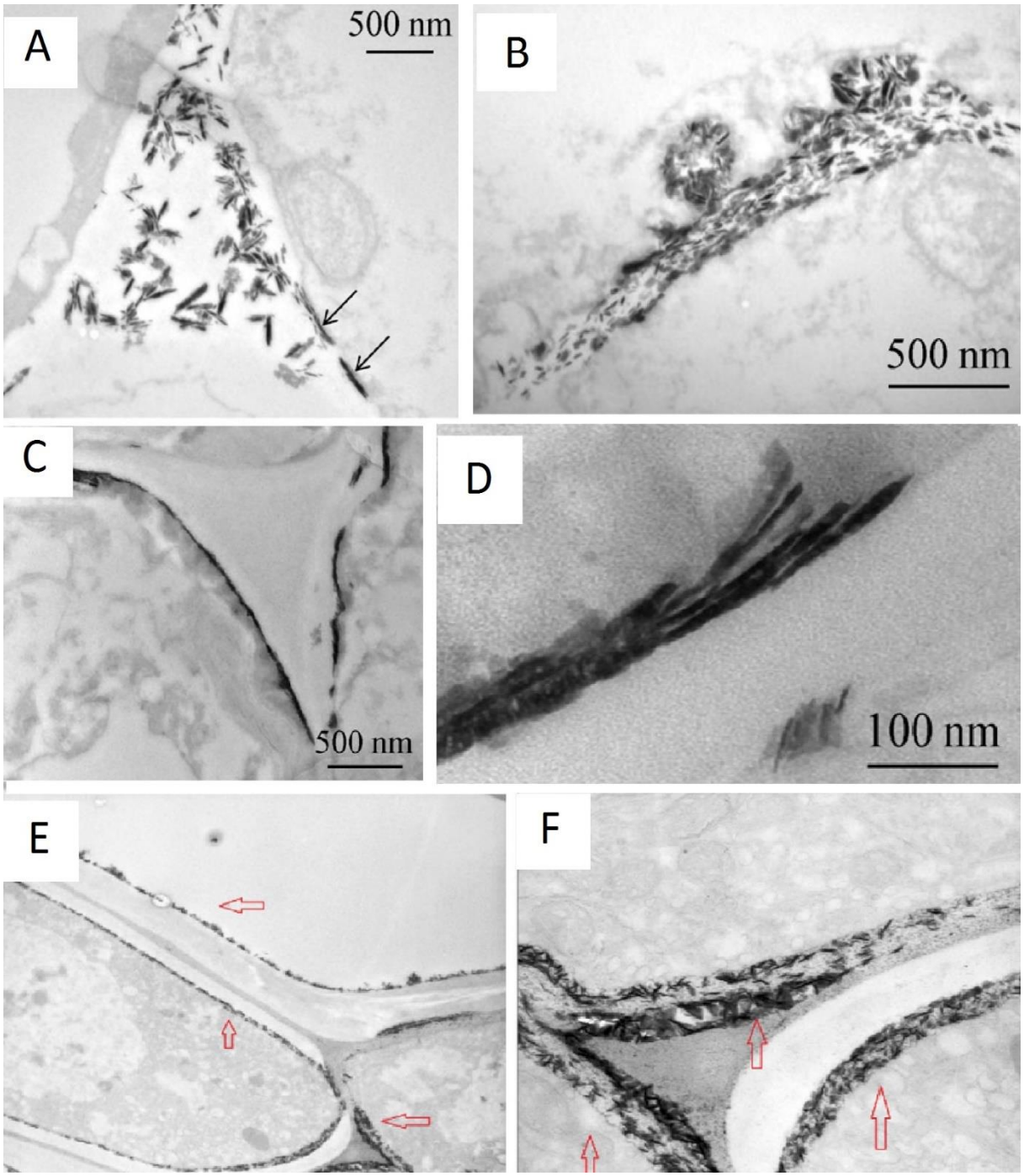
2.1 Faktory ovlivňující příjem uranu

To, jestli a v jakém množství, bude uran transportován do rostliny, je ovlivňováno mnoha faktory. Asi nejmarkantnějším faktorem je oxidační stav uranu, pH média či substrátu a ligand, který je na uran navázaný (Mitchell et al., 2013). To ovlivňuje dostupnost uranu pro rostlinu. Interakce s některými ligandy příjem uranu blokuje. Jako příklad uveďme fosfát, který s uranem tvoří nerozpustné sloučeniny, naopak vazba na jiné sloučenin jeho příjem do rostliny mnohonásobně usnadní, příkladem takové sloučeniny je citrát.

Byly pozorovány velké rozdíly mezi příjmem uranu rostlinou *A. halleri* v hydroponických podmínkách, kde uran naakumulovala stokrát více v kořenech a desetkrát více v listech, než v přirozených podmínkách (Viehweger & Geipel, 2010)

2.1.1 Vazba uranu na anorganické sloučeniny

Za přítomnosti anorganického fosfátu jsou příjem a účinky uranu omezeny v důsledku tvorby ve vodě málo rozpustných urano-fosfátových (U-P) komplexů, které jsou stabilní v rozmezí pH 4,5 - 9. V případě *Pisum sativum* L. bylo pozorováno snížení negativních účinků uranu za přítomnosti fosfátu až o 50% právě díky komplexaci obou výše zmíněných prvků (Ebbs et al., 1998). V případě, kdy byly *Brassica oleracea* L. a *Sinapis alba* L. pěstovány v hydroponickém prostředí s přídavkem uranu a chudém na fosfát, přijímaly uran až 4,5 krát v případě *B. oleracea* L. a až 3,9 krát v případě *S. alba* více než v hydroponickém prostředí s přídavkem fosfátu (Soudek et al., 2011). U *Lupinus albus* L. byly nalezeny na povrchu kořenů komplexy uranu s fosfátem, vápníkem a draslíkem asociované s mucigelem. Tyto komplexy znemožňují příjem jak fosfátu, tak uranu. Dále se U-P komplexy mohou tvořit ve vnějších vrstvách buněčných stěn rhizodermis, což má za následek zamezení toxických účinků uranu. Na příkladu *L. albus* v médiu s přídavkem uranu a adekvátní fosfátovou výživou nebylo pozorováno žádné poškození v důsledku oxidativního stresu zapříčiněného uranem, které však při nedostatku fosfátu v médiu pozorováno bylo. Nedostatek fosfátu naopak umocnil účinky uranu ve smyslu vzniku oxidativního stresu (Tailliez et al., 2013). V případě *Arabidopsis thaliana* L. byl pozorován vznik ve vodě špatně rozpustných urano-fosfátových komplexů v substrátu, na povrchu kořenů, ve vnějších vrstvách buněčné stěny buněk kořenových špiček, ale i uvnitř buněk, konkrétně v mladých



Obrázek 2: A, B ultratenký řez buňkami primární kůry kořene slunečnice, C, D kořen řepky olejky a-, E, F kořen hořčice (šipky ukazují na krystalky uranu)pozorované TEM.
V kořenech slunečnice, řepky olejky a hořčice byly pomocí TEM pozorovány krystalky obsahující uran nejčastěji v komplexu s fosfátem uložené převážně v buněčných stěnách, v apoplasmě, ale i na membránách endocytotických váčků, mezibuněčném prostoru, či na membráně vakuoly.
(A, B, C, D – upraveno podle Laurette et al. 2011a, 72 hodin ve 100 µM U); (E, F upraveno podle Qi et al. 2014, 4 dny ve 150 mg/kg U)

vakuolách nejmladších buněk elongační zóny kořene, čímž byly redukovány toxické účinky uranu. Tyto precipitáty obsahovaly mimo uranu a fosfátu i vápník (Misson et al., 2009). Tvorba urano-fosfátových krystalů byla pozorována i ve slunečnici i řepce olejce v kořenech na buněčných stěnách rhizodermis – viz obrázek 2, ve vakuolách parenchymatických buněk

a v cévní soustavě, v listech byly krystaly pozorovány v mezofylu i epidermis. Pozorované krystaly byly složené z uranu, fosforu a vápníku (Laurette et al., 2011b). Tvorbou špatně rozpustných urano-fosfátových komplexů je výrazně zhoršená dostupnost obou prvků, což může vést k fosfátovému hladovění, poškození membrán a nukleových kyselin. (Vanhoudt et al., 2011b).

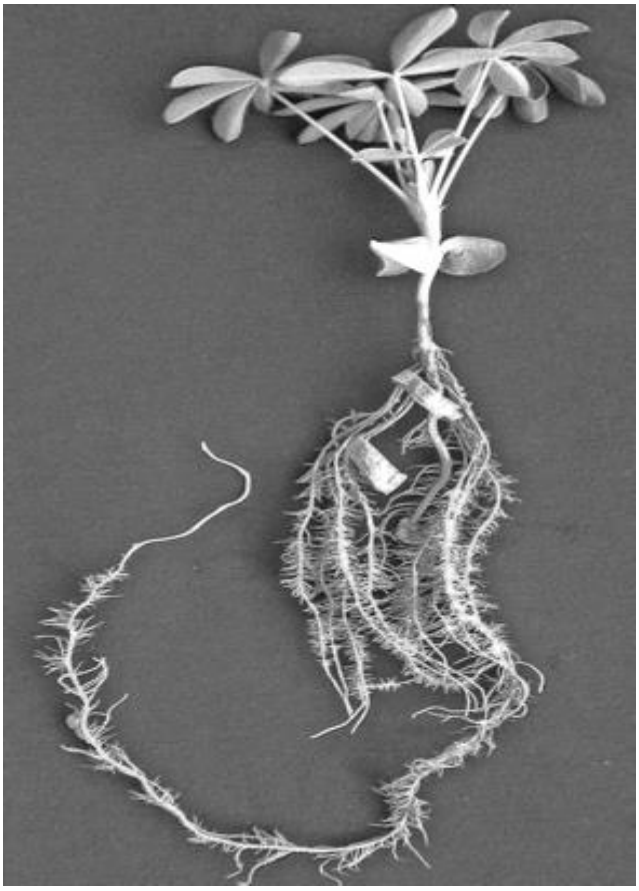
Uran je ale schopen ochotně tvořit komplexy nejen s fosfátem, ale i s dalšími prvky, což může, stejně jako v případě fosfátu, zapříčinit jejich nedostatek v rostlině. U *A. thaliana* bylo při 100 µM koncentraci uranu pozorováno významné nížení koncentrace síry v kořenech i listech nejspíše zapříčiněného tvorbou uranylfosfátu, který může snížit dostupnost síry. Došlo i ke snížení koncentrace draslíku a sodíku v listech i kořenech. Dalšími pozorovanými prvky byli vápník, hořčík a mangan, se kterými tvoří uran stabilní komplexy, což mělo za důsledek snížení koncentrace daných prvků v kořenech a v případě hořčíku a manganu i v listech. V případě železa a mědi došlo ke snížení koncentrace v listech a ke zvýšení jejich koncentrací v kořenech. Koncentrace zinku v listech i kořenech se po přidání uranu snížila. Postižení příjmu a distribuce výše zmiňovaných prvků může mít za následek postižení enzymové kapacity, membránové stability i fotosyntetického aparátu (Vanhoudt et al., 2011b). Při vystavení *A. thaliana* 100 µM koncentraci uranu a 25 µM koncentraci fosfátu došlo ke snížení obsahu mnoha prvků v listech (jednalo se o vápník, hořčík, mangan, draslík, fosfor a síru), naopak dodání fosfátu jejich hladiny zvýšilo (mimo železo, jehož obsah v listech klesl; měď, na jejíž obsah hladina fosfátu neměla vliv) (Vanhoudt et al., 2008), což může být důsledek toho, že uran byl vysrážen fosfátem a nikoliv výše zmiňovanými prvky, díky čemuž zůstaly pro rostlinu přístupné.

2.1.2 Vazba uranu na nízkomolekulární organické kyseliny

Rostliny jsou schopné exsudovat kořeny řadu látek, které jim umožňují mobilizovat živiny ze substrátu. Exsudaci citrátu kořeny do substrátu využívá mnoho rostlin, jmenovitě například *L. albus* a slunečnice (*H. annuus*), pro příjem kovů, primárně fosfátu či železa. Tento mechanismus ale pomáhá solubilizaci i dalších kovů, mezi nimiž je i námi sledovaný uran. Komplexace uranu s citrátem totiž mnohonásobně zvyšuje rozpustnost uranu ve vodě a tím i jeho dostupnost pro rostliny i v substrátu s neutrálním pH (Ebbs et al., 1998). To se rostliny naučily využívat a v průběhu evoluce si některé z nich vyvinuly tzv. klastrové kořeny, což jsou specifické terciální kořeny, které exsudují velké množství citrátu pro uvolnění

primárně fosfátu ze substrátu. Tyto kořeny tvoří například *L. albus* – viz obrázek 3 (Talliez et al., 2013).

V případě *P. sativum* komplexace uranu s citrátem výrazně zvýšila jeho příjem i translokaci do prýtu (Ebbs et al., 1998). U *H. annuus* a *B. napus* bylo dokonce pozorováno, že přidání citrátu do média zabraňuje tvorbě urano-fosfátových krystalků a tím umocňuje příjem uranu kořeny i transport uranu do prýtu (Laurette et al., 2012b). Bylo pozorováno, že pro uvolnění uranu ze substrátu je z možností kombinací kyselina citronová, citrát amonný/kyselina citronová, kyselina šťavelová, EDDS (S,S-ethylendiamin dijantarová kyselina, strukturální isomer EDTAy) a nitrilotrioctová kyselina, nejúčinnější právě kyselina citronová. Nejvíce ale příjem uranu u *B. juncea L.* zvyšovala EDDS, nejlepší výsledky z výše jmenovaných měla i co se týče příjmu uranu rostlinou *Lolium perenne L.* (Duquene et al., 2009). V případě pozorování účinků EDDS a kyseliny citronové na příjem uranu rostlinou *Macleya cordata R. Br.* bylo pozorováno, že při přidání 10 mmol/kg



Obrázek 3: Klastrové kořeny u L. albus se mohou vytvořit při fosfor-deficientních podmínkách. Klastrové kořeny exsudují citrát, který pomáhá při mobilizaci fosforu a dalších kovů ze substrátu. (převzato z http://aob.oxfordjournals.org/content/105/4/F1.medium.gif)

BOX 2: Chelatace

Pochází z řeckého chelè, klepeto. Chelatace je termín znamenající navázání dvou či vícevazebného ligandu na jeden centrální atom. Tento termín se nejčastěji používá při vazbě organické sloučeniny na vícevazebný kationt, většinou dvoj či trojvazebný kov. Látka takto vzniklá se nazývá chelát; oproti původním látkám se pak cheláty mohou vyznačovat jinými fyzikálními vlastnostmi, jako je zvýšená teplota tání, vyšší rozpustnost nebo stabilita, což může ovlivnit přijímání chelatovaných látek organismy. Chelatace se využívá například v medicíně při léčbě otrav některými kovy, při výrobě léčiv, ale i v analytických metodách, jako je například afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC; immobilized metal ion affinity chromatography). (Okacova et al., 2010; http://old.vscht.cz/anl/dolensky/supramol/soubory/2013_SuprChem_BD_Chelation.pdfhttp://old.vscht.cz/anl/dolensky/supramol/soubory/2013_SuprChem_BD_Chelation.pdf; http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chel%C3%A1ty; http://www.ujv.cz/cz/pro-verejnost/slovnik-pojmu/58-chelatace; http://orion.chemi.muni.cz/virtuallab/prehledy/imac.htm).

EDDS způsobilo úhyn dvou rostlin ze tří a přeživší rostliny vykazovaly chlorózu a nekrotické skvrny na listech. Při polovičním (5 mmol/kg) přídavku EDDS, jen menšina rostlin vykazovala projevy toxických účinků, a zároveň docházelo k vyššímu příjmu i transportu uranu do prýtu než při stejném přídavku citrátu a to nejspíše díky lepší dostupnosti komplexu uranyl-EDDS. Zároveň byla pozorována závislost příjmu uranu na koncentraci jeho rozpustné formy v půdním roztoku (Li, 2015).

Při porovnání vhodnosti chelatorů (pojem chelatace viz box 2) kyseliny citronové, EDTAy, kyseliny šťavelové a nitrilotrioctové kyseliny v rámci fytoremediace uranem kontaminovaných substrátů bylo pozorováno, že nejlepší chelator z nich je kyselina citronová – nejlépe z výše jmenovaných umocňuje příjem uranu i jeho translokaci do prýtu, zároveň není pro rostliny toxický, jako je do jisté míry kyselina nitrilotrioctová. Sledované chelatory umocňovaly příjem uranu řazené od nejúčinnějšího kyselina citronová > EDTA > kyselina šťavelová > kyselina nitrilotrioctová. (Jagetiya & Sharma, 2013).

Na *B. juncea* byl prováděn pokus, jak organické kyseliny s malou molekulovou hmotností, konkrétně kyselina citronová, kyselina mléčná, kyselina jablečná a kyselina šťavelová, ovlivňují příjem uranu. Organické kyseliny pomáhaly vyvázat uran ze substrátu, zajímavé bylo, že směs (Mix 3: 2.50 mM kyselina citronová/2.31 mM kyselina jablečná/1.15 mM kyselina šťavelová/0.044 mM kyselina mléčná) uran vyvazovala lépe než jednotlivé kyseliny a nejednalo se pouze o sumaci působení jednotlivých kyselin. Směs příjem uranu znesnadnila, ale celkově zvýšila a výrazně usnadnila jeho transport do prýtu – v prýtu bylo naměřeno dvacetkrát více a v kořenech třikrát více uranu oproti kontrole (Qi et al., 2014). U hydroponicky pěstovaných rostlin *B. oleracea* a *S. alba* bylo pozorováno několikanásobné (až 2,8 krát) zvýšení příjmu uranu po přidání kyseliny vinné do kultivačního média (Soudek et al., 2011). Při porovnávání schopnosti umocnit příjem uranu u kyseliny citronové a citrátu amonného byly naměřeny stejné výsledky (pokus probíhal ve skleníku za použití ochuzeného uranu a na rostlinách: *H. annuus, Kochia scoparia L. Schrad,* a *Z. mays*), Sevostianova se proto domnívá, že citrátový anion je pro zvyšování příjmu ochuzeného uranu významnější než zvyšování rozpustnosti sloučenin obsahujících ochuzený uran, což se dělo převážně za pomoci amonného kationu. Zároveň se využití kyseliny citronové vyplatí i z hlediska ceny – je přibližně o 60% levnější než citrát amonný (Sevostianova et al., 2010).

2.2 pH

Pro příjem uranu je velmi důležité pH, za kterého je rostlina pěstována, ať už v substrátu, médiu či půdním roztoku. Za nižších pH dochází k vyvázání uranu z hornin do roztoku za tvorby především volných uranylových iontů (UO_2^{2+}), které rostliny přijímají ze sloučenin uranu nejsnadněji, zatímco za pH vyšších než 7 se uran vyskytuje převážně ve formě karbonátů (Ebbs et al., 1998). Na případu *A. thaliana* při kontaminaci uranem při pH 4,5 a 7,5 bylo pozorováno, že byl při pH 4,5 byl uran více přijímán kořeny, ale zůstával v nich, kdežto při pH 7,5 byl přijímán méně, ale snadněji se transportoval do prýtu. Při 100 µM koncentraci uranu byl v pH 4,5 přibližně čtyřikrát vyšší příjem než při pH 7,5 (Saenen et al., 2014). Velice podobné výsledky byly pozorovány u slunečnic, které využívají pro příjem kovů, primárně železa, ze substrátu jeho okyselování pomocí exsudace citrátu. Díky tomu dochází k řádově desetinásobnému zvýšení příjmu obou kovů – v případě železa se vyšších hodnot přijatého prvku dosahovalo při vyšší koncentraci citrátu (pH 2,8), kdežto v případě uranu při nižší koncentraci citrátu (pH 3,6) (Mihalik et al., 2012). Využití citrátu pro solubilizaci kovů používají i další rostliny, například *L. albus,* který vylučuje velké množství citrátu klastrovými kořeny pro solubilizaci fosfátu (Talliez et al., 2013). Komplexace s citrátem totiž mnohonásobně zvyšuje rozpustnost uranu ve vodě a tím i jeho dostupnost pro rostliny (Ebbs et al., 1998). Na pšenici, řepce olejce a slunečnicích bylo po vystavení UO_2^{2+} pozorováno, že absorpce uranu a jeho adsorpce kořeny je vysoká, ale transport kořeny je limitován precipitací uranu na buněčných stěnách. Komplexace uranu s citrátem nebo karbonátem výrazně zvyšuje jeho příjem, naopak komplexace s fosfátem u všech výše zmíněných zkoumaných druhů snížila akumulaci uranu v prýtu v důsledku jeho precipitace a adsorpce na povrchu kořenů (Laurette et al., 2012a).

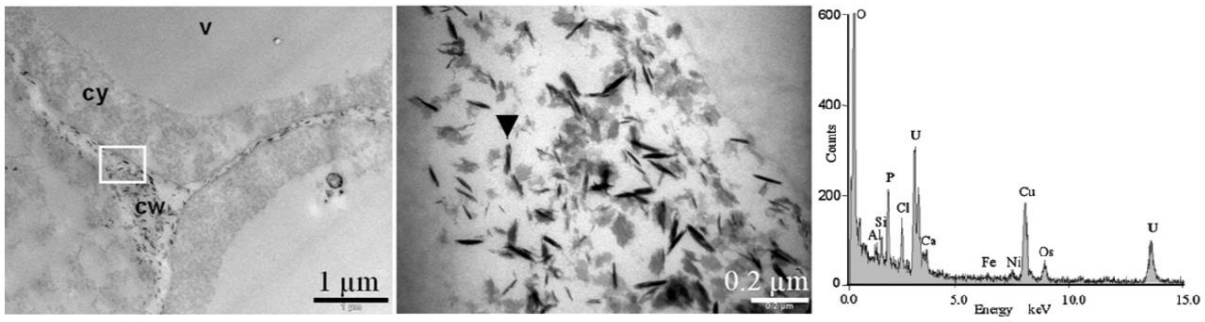
Nízké pH ale není vždy pro vstřebávání uranu výhodné. Při pH 5,7 byla pozorována precipitace uranu s fosfátem za tvorby ve vodě těžko rozpustných uranyl-fosfátových komplexů, ze kterých již *A. thaliana* nebyla schopná fosfát ani uran získat a projevily se na ní účinky fosfátového hladovění (Misson et al., 2009). Zároveň, klesne-li pH příliš, dochází k poškození vodní rovnováhy v kořenech rostliny. Při výzkumu příjmu uranu kořeny za určeného pH hydroponicky pěstovaného *A. thaliana* začaly kontrolní rostliny při pH 4,5 vadnout v důsledku poškození vodní rovnováhy v kořenech. Další reakcí na nízké pH bylo zvýšení aktivity antioxidačních enzymů (Vanhoudt et al., 2011c). Při pH 5,5 již problémy s disbalancí vodní rovnováhy nebyly pozorovány (Saenen et al., 2013).

3 Faktory ovlivňující translokaci uranu do prýtu

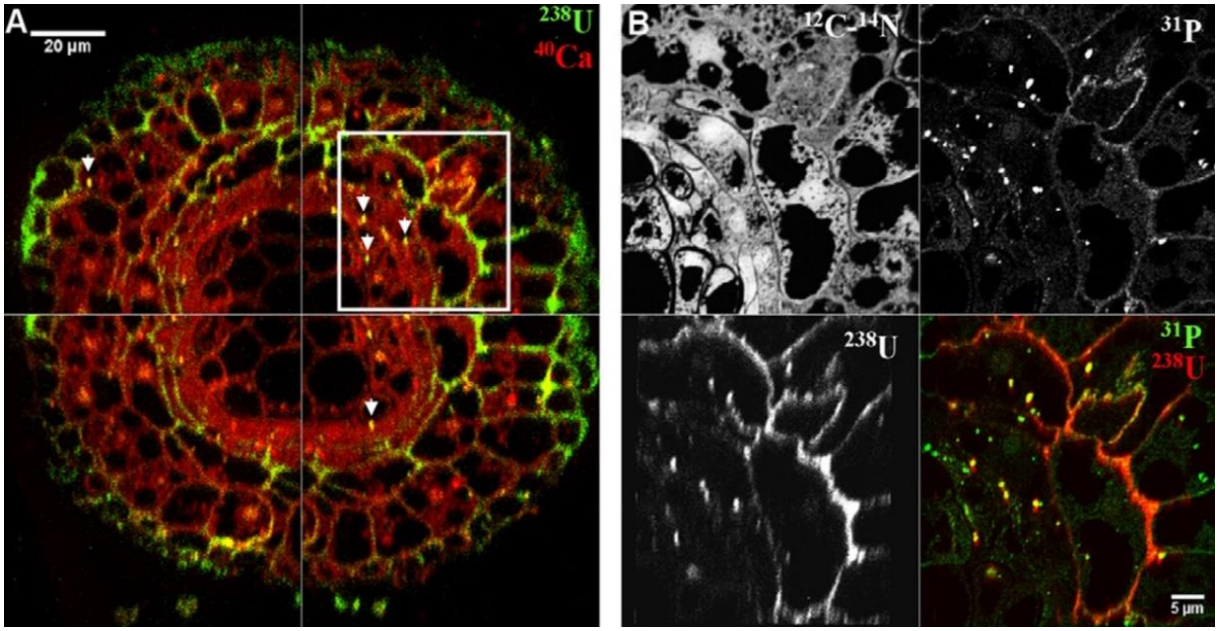
3.1 Metody studia translokace uranu

Metody studování alokace radionuklidů, v našem případě uranu, jsou různé. Jednou z časnějších metod byla například autoradiografie, jejímž principem je vystavení citlivého fotografického filmu záření vyvolaného zkoumaným objektem. Výsledkem je pak autoradiografický snímek neboli autoradiogram (viz obrázek 4) vypovídající o rozložení a množství radioizotopu. V současnosti je již možné pro stanovení obsahu využívat mnohem přesnější metody, jako je například ICP-MS (inductively cpupled plasma mass spectrometry; hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem), ICP-OES (inductively coupled plasma - optical emission spectrometry; optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem), ICP-AES (inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry; atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem), AAS (atomic absorption spectrometry; atomová absorpční spektrometrie), nanoSIMS (sanoscale secondary ion mass spectrometry; hmotová spektrometrie sekundárních iontů na mikroskopické úrovni), TEM-EDX (transmission electron microscopy with energy dispersive X-Ray analysis; transmisní elektronová mikroskopie s energeticky-disperzní analýzu rentgenového záření) viz obrázek 5, PIXE (particle induced X-ray emission; analýza částicově indukované rentgenového záření) viz obrázek 6, XAS (X-ray absorption spectroscopy; spektroskopie absorpce rentgenového záření).

Obrázek 4: Vlevo snímek vylisované a usušené Armoracia rusticana L., vpravo autoradiografický snímek (autoradiogram), rostlina byla vystavena na 7 dní 1 mM koncentraci uranu. Expoziční čas autoradiogramu byl tři měsíce (převzato ze Soudek et al., 2011)



Obrázek 5: TEM-EDX, první dva obrázky (úplně vlevo menší zvětšení, uprostřed pak výrazně větší zvětšení oblasti označené bílým obdélníčkem) jsou snímky z transmisního elektronového mikroskopu vnějších buněk elongační části kořene A. thaliana *pěstované ve fosfor deficientním médiu s přídavkem 500 µM uranu, cw: buněčná stěna (cell wall); cy: cytoplasma; v: vakuola. Vpravo je pak výsledek EDX analýzy bodu označeného na prostředním obrázku šipkou (převzato Misson et al., 2009).*



Obrázek 6: PIXE; nanoSIMS mapa kořenové čepičky A. thaliana, *^{238}U zeleně, ^{40}Ca červeně, bílé šipky ukazují na vnitrobuněčná místa akumulace uranu (A). B ukazuje bílý výsek z mapy A, ^{12}C-^{14}N ukazuje organické struktury ve vzorku, na spodním pravém obrázku je pak ukázána superpozice ^{31}P- zeleně a 238 U – červeně (převzato z Misson et al., 2009).*

3.2 Faktory ovlivňující translokaci

Z hlediska fytoremediace je jednou z nejdůležitějších schopností rostlin schopnost transportovat přijatý polutant, v tomto případě uran, do nadzemních částí rostlin.

I translokace uranu do prýtu výrazně závisí na pH, *A, thaliana* při pH 7,5 translokovala uran do listů přibližně 15 krát více než při pH 4,5. (Saenen et al., 2014). Téměř přesně opačný výsledek ale vyšel Ebbsovi, kdy při snížení pH (z pH 6,5 na pH 5) za pomoci přídavku citrátu se zvýšila translokace uranu do prýtu červené řepy 14 krát (Ebbs et al., 1998). Je možné, že je rozpor ve výsledcích zapříčiněn použitím jiné rostliny, nebo i tím, že Saenen nepěstovala *A. thaliana* za přítomnosti citrátu, který usnadňuje transport uranu do prýtu. Obdobný výsledek jako u Ebbse byl pozorován i v případě slunečnic, kde po přidání citrátu do média (původní pH 4,5) se do listů natransportovalo 12 až 17 % celkového množství přijatého uranu, kdežto kontrolní rostlina uran z kořenů translokovala jen minimálně. Železo, pozorované u slunečnic společně s uranem, ale bylo translokováno po přídavku citrátu do prýtu velice ochotně, až 90 % z celkově přijatého železa (Mihalik et al., 2012). A i na dalších rostlinách, jmenovitě na řepce olejce a pšenici, bylo pozorováno totéž. Komplexace uranu s citrátem nebo karbonátem výrazně zvyšuje jeho transport do prýtu a ukládání v listech (Laurette et al., 2012a). Oproti tomu ale přídavek kyseliny šťavelové neměl na koncentrace uranu v prýtu *B. juncea* a *L. perenne* žádný výsledek. Nejvyššího zvýšení koncentrace uranu

v prýtu *B. juncea* se z možností přídavku kyseliny citronové, citrátu amonného/kyseliny citronové, kyseliny šťavelové, EDDS a kyseliny nitrilotrioctové dosáhlo přidáním EDDS, přičemž ale uran vyvazoval ze substrátu o polovinu hůře než kyselina citronová – nejspíše je tedy pro *B. juncea* dostupnější komplex uranyl-EDDS než komplex uranyl-citrát (Duquene et al., 2009). Obdobné výsledky byly pozorovány i v případě *Macleaya cordata*, kde je také EDDS pro transport do prýtu účinnější než citrát aplikovaný ve stejném množství (Li et al., 2014).

Přítomnost fosfátu drasticky omezuje transport uranu do prýtu z důvodu komplexace uranu s fosfátem za tvorby nerozpustných komplexů $(UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 6\ H_2O$, ze kterých pak rostliny ani jeden prvek nedokáží získat. Ta probíhá převážně na povrchu kořenů a v samotných kořenech (viz výše) (Misson et al., 2009)

4 Fyziologické účinky uranu na rostliny

Jak již bylo výše několikrát zmíněno, uran je toxický nejen pro organismy ale i pro rostliny. V případě rostlin není až tak závažná jeho radioktivita. Rostliny se oproti živočichům mimo jiné i díky možnosti polyploidizace a možnosti neukončeného růstu snadněji vypořádávají s jeho mutagenními účinky a nepřekročí-li radioaktivita určitou mez, jsou schopny v uranem kontaminovaném prostředí přežít. Nelze však říci, že by uran neměl v případě rostlin genotoxické účinky. Poškození DNA bylo například pozorováno u *P. vulgaris* při 1000µM koncentraci uranu (Vandenhove, 2008). Zásadním problémem je ale pro rostliny chemická toxicita uranu. Uran je těžký kov a podobně jako jiné těžké kovy vyvolává oxidativní stres, působí na proces fotosyntézy a vyvolává změny na úrovni struktury zejména u kořene, kde nejčastěji oxidativně působí na buněčné membrány.

4.1 Vliv na růst

Růst kořene *A. thaliana* byl výrazně snížen při vystavení 100µM koncentraci uranu v substrátu v důsledku poškození plazmatických membrán oxidativním stresem buněk (Vanhoudt et al., 2011c). *A. thaliana* pěstovaný v médiu s přídavkem uranu s výslednou koncentrací 25 při µM pH 4,5 a 5,5 vykazoval oproti kontrole pěstované bez přídavku uranu výrazné snížení biomasy kořene i prýtu (Saenen et al., 2013). Při pěstování *H. annuus* na hlušině získané v Umerském dole (Indie) se většině semen nepodařilo vyklíčit, a pokud ano, většina ze sazeniček brzy uhynula. Pokud byla hlušina smíchaná se zahradním substrátem (75% hlušiny), rostliny již přežívaly, ale plocha listů, čerstvá hmotnost, délka kořene i listů byla oproti kontrolním rostlinám pěstovaným pouze v zahradním substrátu snížená

BOX 2: Hormeze

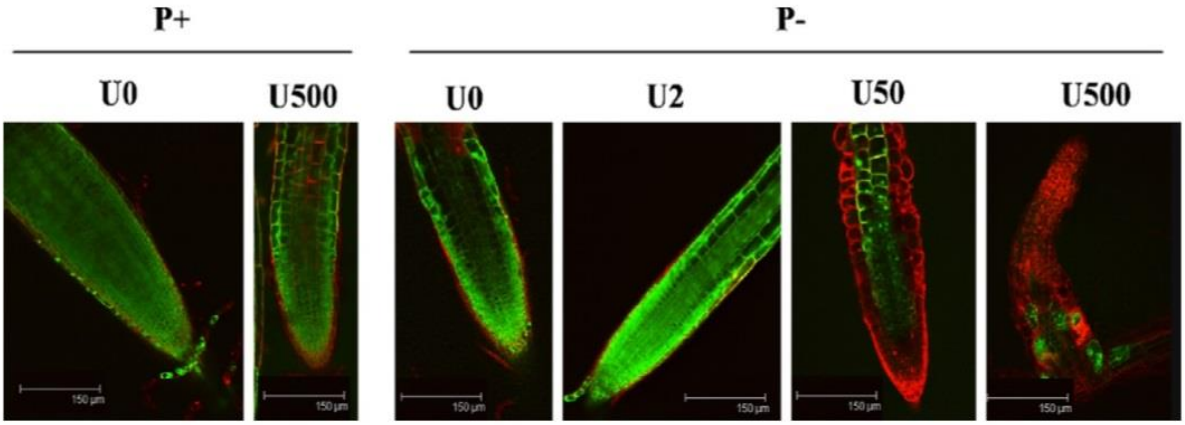
Pochází z řeckého horman*, povzbudit. Hormeze je kladná/stimulační reakce na podání malé dávky jinak při vyšší dávce toxické látky. E. J. Calabrese a L. A. Baldwin hormezi definují jako adaptační rekci vyznačující se dvoufázovou odpovědí na podnět (myšleno nízkou dávku toxické látky/ionizačního záření/stresu/poškození), kdy první reakce je přímo indukovaná stimulační a druhá je kompenzační, ke které dochází v důsledku narušení homeostázy, například opravné mechanismy působící nad rámec prvotního poškození (Calabrese & Baldwin, 2002). V oblasti biologie a medicíny je termín hormeze definován jako adaptivní reakce buněk a organizmů na mírný (obvykle přerušovaný) stres. Je to proces, při kterém vystavení nízké dávce chemické látky nebo faktor prostředí, které jsou nebezpečné při vyšších dávkách, indukuje adaptivní příznivý vliv na buňky nebo organismus (Mattson, 2009). Při vystavení organismu nízkým dávkám je pravděpodobnost adaptační reakce větší než riziko poškození, zároveň však adaptační reakce nevylučuje riziko poškození organismu (http://unm.lf1.cuni.cz/vyuka/slovnicek_verze_120106.pdf). Příkladem hormeze jsou třeba stimulační působení radiačního záření, získání rezistence bakterií při podání velmi nízké hladiny antibiotik, adaptační reakce na nízké dávky záření spočívající ve stimulaci reparačních mechanismů buněk korigujících zlomy DNA, mnoho látek používaných jako léky je při vyšších dávkách toxických, ale při správném dávkování mají pozitivní účinky (Calabrese, 2002; Mattson, 2008; http://unm.lf1.cuni.cz/vyuka/slovnicek_verze_120106.pdf), léčebné lázně v Jáchymově, saunování…*

(Jagetiya & Purohit, 2006). Při expozici *A. thaliana* 100 µM uranu bylo pozorováno již první den snížení čerstvé hmotnosti listů i kořene, ale v důsledku narušení vodní rovnováhy, rostliny začínaly vadnout. Při expozici nižším koncentracím (1 a 10 µM) došlo během tří dnů naopak ke zvýšení čerstvé hmotnosti. Vanhoudt se domnívá, že může jít o případ hormeze (termín hormeze viz box 2) (Vanhoudt et al., 2011b) stejně Straczek, který pozoroval nízkých koncentracích uranu (2,5 – 5 mg U/L) stimulaci růstu sekundárních kořenů u *Daucus cordata L.* (Straczek et al., 2009) a Lábusová, která pozorovala akumulaci biomasy *N. tabacum* vystaveného 500 µM koncentraci uranu v médiu (Lábusová, 2010). Podíl sušiny vykazoval podobný trend. Expozice 100 µM uranu snížila a po třech dnech zastavila růst kořene, 1 µM uranu způsobila zvýšení délky kořene, stejně jako 10 µM, při kterém ale došlo po třech dnech k redukci délky kořene a po sedmi k projevům toxicity (Vanhoudt et al., 2011b). Při vystavení 5 µM uranu bylo na hrachu pozorováno snížení podílu sušiny, zakrnění bočních kořenů a zčernání kořenových čepiček (Ebbs et al., 1998). Výrazné snížení růstu prýtu bylo pozorováno i při pH 4,5 a 7,5 při koncentracích uranu od 6,25 do 100 µM, kde na kontrolách pěstovaných bez přídavku uranu snížení růstu pozorováno nebylo. Zároveň bylo pozorováno zvýšení podílu sušiny při pH 4,5 v důsledku vodního stresu (Saenen et al., 2014). 24 hodin po přidání uranu do živného média (50 µM) se již čerstvá hmotnost prýtu i kořenů *A. thaliana* nezvýšila, délka listů ani velikost listové plochy se nezměnila, růst rostlin

se zastavil (Vanhoudt et al., 2014). I v případě *Lemna minor L.* došlo po přídavku uranu ke snížení růstu – v případě této rostlinky měřeno čerstvou hmotností (Horemans et al., 2015) Při expozici *A. thaliana* 100 µM koncentraci uranu bylo pozorováno snížení růstu kořenů o 70 % i listů – o 38 % (Vanhoudt et al., 2008) Při expozici *H. annuus* uranu došlo ke snížení růstu prýtu i kořenů, spojenému se ztrátou turgotu a roztažnosti buněčné stěny (Jagetiya & Purohit, 2006). Každá rostlina má ale hranici pro toxické působení uranu jinou. V případě *Phaseolus vulgaris L.* došlo k zastavení růstu až při přídavku uranu 1000 µM, kdežto nižší sledované koncentrace (0,1; 1; 10; 100 µM) způsobily zvýšení růstu (Vandenhove et al., 2006).

Při vystavení 100 µM koncentraci uranu vykazovaly rostliny *A. thaliana* po čtyřech dnech chlorózy a kořeny jim zežloutly (Vanhoudt et al., 2008). Totéž bylo pozorováno i o tři roky později, kdy při vystavení *A. thaliana* 100 µM koncentraci uranu bylo pozorováno zežloutnutí listů (po třech dnech) a kořenů (po sedmi dnech) nejspíše v důsledku tvorby antokyanů jako ochrany proti oxidativnímu stresu (Vanhoundt et al., 2011b).

Pokud ale byly rostliny *A. thaliana* pěstované v médiu s přídavkem fosfátu, nedocházelo k žádným negativním efektům na biomasu ani při vysokých koncentracích uranu. V médiu s přídavkem uranu nedocházelo k porušení životaschopnosti buněk vnějších vrstev kořene, naopak ve fosfát deficientním médiu při koncentraci uranu vyšší než 2 µM docházelo k výraznému postižení životaschopnosti buněk – viz obrázek 7 (Misson et al., 2009) Přítomnost 20 µM uranu ve fosfát deficientním médiu postihla vývoj klastrových kořenů u *L. albus*, které odumíraly dříve, než stačily dorůst do plné velikosti a funkčnosti (Talliez et al., 2013) Pro zastavení většiny toxických účinků 100 µM koncentrace uranu na



Obrázek 5: Konfokální mikroskopické pozorování kořenů Arabidopsis thaliana vystavených U a vizualizace životaschopnosti buněk. Pět dní po převodu do média obsahujícího x µM U (U x v legendě) s (P +) nebo bez (P-) fosfátového přídavku, rostliny jsou obarveny FDA a PI. Životaschopné buňky vykazují zelenou fluorescenci kvůli FDA, zatímco PI barví mrtvé buňky v červeně. Měřítko tyče představují 150µm. (převzato Misson et al., 2009)

A. thaliana stačilo 25 µM koncentrace fosfátu. Zůstaly některé projevy na expresní a enzymatické úrovni, například exprese genu pro peroxizomální katalázu reagovala na přítomnost uranu (Vanhoudt et al., 2008).

4.2 Oxidativní stres působením uranu

Zhášení volných radikálů se děje neenzymatickou nebo enzymatickou cestou. Neenzymatická cesta je zastoupena převážně hormony. Z nich například cytokininy mají mimo mnoha dalších funkcí i podstatnou roli v obraně proti stresu (Choi et al., 2011). Rostliny syntetizují velké množství různých cytokininů s různými funkcemi, například trans-zeatin , N^6-isopentenyladenin (iP), cis-zeatin, iP cukerné deriváty a mnoho dalších (Lubovská, 2015). Práce, které jsem našla, se ale věnují převážně enzymatické cestě.

4.2.1 Metody studia zhášení volných radikálů

Při zkoumání zhášení volných radikálů neenzymatickou cestou, zjišťují se obsahy různých látek aktivních při neenzymatickém zhášení volných radikálů a to nepaříklad metodou HPLC (High Performance Liquid Chromatography; vysokotlaká kapalinová chromatografie).

V případě výzkumu enzymatické cesty zhášení volných radikálů se pak studují aktivity enzymů nebo je možné zjišťovat množství exprimovaných genů spojených s daným enzymem. Aktivity enzymů se zjišťují například spektrofotometrickými metodami, polarograficky nebo pomocí zymografie. (Lubovská, 2014)

4.2.2 Enzymatické cesta zhášení volných radikálů

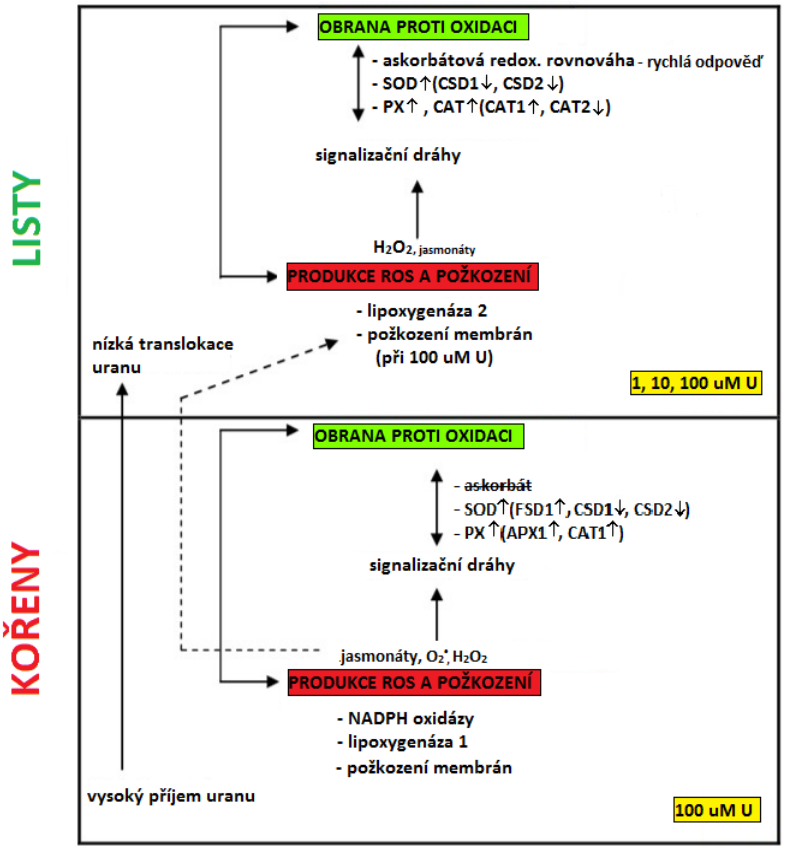
Oxidativní stres působením uranu se projeví i na úrovni genové exprese, jak bylo pozorováno u *A. thaliana* pěstovaného v substrátu s od 0,1 do 100µM koncentrace uranu bylo pozorováno působení oxidativního stresu na expresi genů pro různé enzymy v kořenech. Při nižších koncentracích by nejspíše později došlo ke stejným projevům jako při 100µM koncentraci uranu. Při 100µM koncentraci uranu došlo v kořenech v prvních dnech ke zvýšení exprese genů ROS-produkujících enzymů – lipoxygenáza 1, homology NADPH-oxygenázy (nikotinadenindinukleotidfosfát dehydrogenáza) typické pro oxidativní vzplanutí – RBOH – „respiratory burst oxydase homolog“ (RBOHC, RBOHD, RBOHF) a peroxidázy buněčné stěny. Poté došlo v prvním dni ke zvýšení exprese i kapacity pro enzymy vychytávající reaktivní kyslíkové radikály: isoformy superoxid dismutázy (CSD 1 – cytoplasmatická Co/Zn

superoxid dismutáza, CSD 2 – plastidová cytoplasmatická Co/Zn superoxid dismutáza, FSD 1 – plastidická Fe superoxid dismutáza, MSD 1 – mitochondriální Mn superoxid dismutáza) a kataláza 1 (Vanhoudt et al., 2011c). U *A. thaliana* pěstovaného tři dny v médiu s přídavkem uranu s výslednou koncentrací 25 µM bylo při pH 4,5 pozorováno výrazné zvýšení aktivity superoxid dismutázy a guajakol peroxidázy v kořenech oproti rostlinám pěstovaným ve vyšším pH, zároveň došlo i ke zvýšení aktivity superoxid dismutázy a katalázy v listech (Saenen et al., 2014). Po čtyřech dnech vystavení 100 µM koncentraci uranu se exprese genu pro peroxisomální katalázu u *A. thaliana* v kořenech zvýšila, ale kapacita tohoto enzymu se snížila, stejně jako v listech, tam ale došlo ke snížení na úrovni exprese i kapacity peroxisomální katalázy. Kvůli domu dochází ke snížení detoxifikace H_2O_2, což se podílí na oxidativním stresu v rostlině (Vanhoudt et al., 2008).

Při vystavení *A. thaliana* 100 µM koncentraci uranu v médiu došlo v listech ke zvýšení antioxidační obrany pomocí askorbát-glutationové dráhy (Vanhoudt et al., 2008). Po vystavení *A. thaliana* 100µM koncentraci uranu došlo v pozdějších dnech k narušení askorbát-glutationového cyklu v kořenech v důsledku zvýšeného využití askorbát peroxidázy pro detoxikaci H_2O_2, kdy se rovnováha askorbát/dehydroaskorbát posunula ve prospěch oxodované formy (Vanhoudt et al., 2011c). Zvýšení aktivity gutation reduktázy v kořenech *A. thaliana* vystavenému 25µM koncentraci uranu mělo za důsledek zvýšení recyklace oxidované formy glutationu na glutation, který je prekurzorem pro fytochelatiny, proteiny schopné vázat a detoxifikovat těžké kovy (Saenen et al., 2014) Zvýšená hladina glutationu byla pozorovaná i v listech *P. vulgaris*, které bylo vystaveno 1000 µM koncentraci uranu v médiu – pro tuto rostlinu se ale hladina, kdy uran začal působit toxicky, pohybovala mezi až 100 a 1000 µM uranu v médiu (Vandenhove et al., 2006).

Reakce kořenů a listů na vystavení znečištění uranem se liší (viz obrázek 8). Účinky vystavení *A. thaliana* uranu se oproti kořenům, na kterých jsou projevy patrné hned první den, projeví na listech až po několika dnech. První den pokusu byl obsah uranu v suché hmotnosti listů rostliny pěstované za přítomnosti uranu srovnatelný s kontrolními rostlinami, tedy 8 ± 1 µg/g listu. Teprve třetí den byl uran natranslokován do listů v dostatečné míře, jeho hodnoty byly 10 ± 2 µg/g listu, aby bylo pozorováno zvýšení kapacity aspartát peroxidázy, superoxid dismutázy, katalázy a askorbát peroxidázy v listech, jejichž hodnoty se po sedmi dnech ustálily. Do doby, než byl uran do listů natranslokován v dostatečné míře, byl oxidativní stres generován nejspíše převážně mechanismy souvisejícími s translokací ve směru kořen-prýt (Vanhoudt et al., 2011a).

Oproti kořenům, kde se v rámci první obrany u *A. thaliana* primárně exprimovala lipoxygenáza 1 lokalizovaná v cytoplasmě, se v listech exprimovala lipoxygenáza 2 lokalizovaná v chloroplastech, jejíž hladina se postupně zvyšovala, kdežto hladina lipoxygenázy 1 postupně klesala. Z toho vyplývá, že chloroplasty mají významnou roli v boji proti oxidativnímu stresu zapříčiněnému uranem, ale i dalšími těžkými kovy. Z výsledků dále vyplývalo, že hlavní dráha oxidativního vzplanutí v listech neprobíhá přes NADPH-oxidázu jako v listech, neboť se hladiny jejích isoforem v listech rostlin *A. thaliana* vystavených uranu neměnily. Hlavní enzymy, které se podílely na vypořádání se s oxidativním vzplanutím, byly katalázy a peroxidázy. Velkou roli hrála i askorbát-glutationová dráha v listech, kdy se rovnováha přesunula více k redukované formě askorbátu, což mělo velký podíl na detoxifikaci peroxidu vodíku. Zároveň se výrazně zvýšilo množství reaktivních komponent kyseliny thiobarbiturové, které poškozovaly membrány v buňkách. (Vanhoudt et al., 2011a). Po vystavení *A. thaliana* 100 µM koncentraci uranu v médiu bylo pozorováno výrazné zvýšení úrovně peroxidace lipidů způsobených reaktivními komponenty kyseliny thiobarbiturové, což mělo za následek poškození funkčnosti a integrity buněčných membrán (Vanhoudt et al., 2008)



Obrázek 6: Přehled odpovědí na oxidativní stres v kořenech a listech A, thaliana. SOD – superoxid dismutáza; CSD1 - cytoplasmatická Co/Zn superoxid dismutáza; CSD2 - plastidová cytoplasmatická Co/Zn superoxid dismutáza; PX - peroxidáza; CAT- kataláza; CAT1 – kataláza 1; CAT2 – kataláza 2; SFD1 – plastidická Fe superoxid dismutáza; APX1 – askorbát peroxidáza; NADPH oxigenáza - nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxigenáza (Převzato z Vanhoudt et al., 2011a)

Změny v kapacitě enzymů v kořenech *P. vulgaris* byly při 0,1, 1, 10 a 100 µM externí koncentraci uranu jasně patrné až čtvrtý den pozorování, kdy se zvýšila kapacita všech sledovaných enzymů (guiakol peroxidáza, glutation reduktáza, syringaldazin peroxidáza,

superoxid dismutáza, isocitrát dehydrogenáza a glukóza-6-fosfát dehydrogenáza) mimo kapacitu SOD a zvyšovala se s postupně se zvyšující koncentrací uranu v kořenech. Při 1000 µM externí koncentraci uranu bylo v kořenech pozorováno snížení enzymových kapacit pozorovaných enzymů. Pro různé peroxidázy (guaiakol peroxidáza a syringaldazin peroxidáza) a glukosa-6-fosfát dehydrogenázu dokonce již nebyly kapacity naměřeny. Enzymové kapacity v listech nebyly přídavkem uranu ovlivněny v důsledku nízkého natranslokování uranu do listů (Vandenhove et al., 2006). I v rámci odpovědi *A. thaliana* na vystavení 100µM konecntraci uranu v médiu bylo pozorováno výrazné snížení kapacity guajakol peroxidázy i syringaldazin peroxidázy (Vanhoudt et al., 2008)

4.3 Fotosyntéza

Při pH média 7,5 nebylo prokázáno působení uranu na fotosyntetický aparát *A. thaliana*. Při nízkém pH média (pH 4,5) dochází k účinnějšímu přenosu elektronů z fotosystém II na elektron transportní řetězec a tím zvýšení výnosů z fotosyntézy. Energie získaná z fotosyntézy je pak použita spíše na vyrovnání se s oxidativním stresem než pro růst. Rostliny pěstované s přídavkem uranu ale nevykazovaly ve fotosyntetických parametrech oproti kontrole rozdíl (Saenen et al., 2014). V případě *L. minor* pěstovaném v médiu při pH 5 a přídavku uranu 0,5 – 10,0 µM bylo oproti kontrole pozorováno výrazné zvýšení koncentrace chlorofylu a, chlorofylu b i karotenoidů (Horemans et al., 2015). Je možné, dle mého názoru, že zvýšení fotosyntetických pigmentů při relativně nízké koncentraci uranu mohlo souviset s reakcí vedoucí ke zvýšení kapacity fotosyntézy pro eneregeticky náročné detofxifikační mechanismy při vyrovnávání se s oxidativním stresem. Naopak snížení celkového chlorofylu bylo pozorovánu u H. annuus pěstovaného v hlušině z Umerského dolu (75 %) smíchané se zahradním substrátem (Jagetiya & Purohit, 2006), i u *Nicotiana sp.* (chlorfyl a, chlorofyl b, karotenoidy) (Soudek at al., 2014) i u *A. thaliana* pěstovaného při 50 µM koncentraci uranu v médiu bylo pozorováno výrazné snížení koncentrace pigmentů (chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy) vztažené k hmotnosti sušiny. I přes to ale nedošlo k narušení fotosyntézy, naopak se optimalizovala její účinnost, jež byla sledována pomocí měření potenciální efektivnosti fotosystému II (Vanhoudt et al., 2014). Snížení biosyntézy chlorofylu může být důsledkem nahrazení centrálního hořečnatého atomu chlorofylu uranem (Lábusová, 2014 cit. podle Jain & Aery, 1997)

5 Využití poznatků o mechanismech příjmu a translokace uranu v rostlinách pro využití ve fytoremediačních technikách

I když se fytoremediačními technologiemi lidstvo už nějakou dobu zabývá, stále není dořešeno mnoho detailů. A oproti těžkým kovům je přístup k fytoremediaci radionuklidů poměrně nový (Vandenhove, 2013). Jedním z nejzásadnějším z nich je problém jak naložit se vzniklou kontaminovanou biomasou. Je třeba ji odstranit z volné přírody, neboť díky tomu, že je příroda otevřený systém, se může kontaminace sekundárně šířit dál potravním řetězcem, podzemními a povrchovými toky, ale i pomocí eroze. Takto kontaminovanou biomasu je třeba přesunout do uzavřeného prostředí například spaloven, kde se již lze zneškodňovat nesrovnatelně drastičtějšími metodami než v otevřeném prostředí přírody aniž by hrozilo nebezpečí zavlečení další kontaminace.

V budoucnosti můžeme očekávat další kontaminaci prostředí uranem v kontextu jaderné energetiky. Množství lidí na planetě neustále roste a tento růst vede k růstu energetických nároků. Je důležité si uvědomit, že s růstem světové populace rostou i nároky na životní úroveň, díky čemuž je nárůst potřeby energie čím dál tím vyšší. Domnívám se, že tyto nároky nebude možné uspokojit bez využití jaderné energie. V důsledku toho budou vznikat další podzemní uložiště ale i další kontaminované plochy. Zároveň bude třeba se postarat o areály vytěžených dolů. Česká republika má relativně velké zásoby uranu, koncem roku 2013 to bylo 135 144 tun, máme sedm výhradně evidovaných ložisek (Rožná, Břevniště pod Ralskem, Jasenice-Pucov, Stráž pod Ralskem, Brzkov, Hamr pod Ralskem, Osečná-Kotel), z čehož těžba dnes probíhá pouze v jednom – v Rožné (http://www.geology.cz/extranet/publikace/online/surovinove-zdroje/SUROVINOVE-ZDROJE-CESKE-REPUBLIKY-2014.pdf).

Při studiu mechanismů příjmů a translokace prvků rostlinami, získáváme informace o odezvě určitého druhu či genotypu na přítomnost kontaminantu v prostředí. Obecně je známo, že schopnost fytoremediace je významně druhově i geneticky specifická, bohužel v případě uranu byla podrobněji zkoumána jen na několika málo rostlinných druzích. Tyto informace budou do budoucnosti velmi cenné, protože bez porozumění mechanismům příjmu a translokace uranu rostlinami, ale i mechanismům působením uranu v rostlině, nemůže být nikdy plně využit potenciál fytoremediace.

6 Závěr

Uran je radionuklid přirozeně se vyskytující v malých koncentracích v zemské kůře. Vlivem antropogení činnosti se ale jeho obsah zvyšuje a stává se nebezpečným. Bohužel je do budoucnosti nutné počítat s přibývání antropogenních uranových kontaminací, je proto třeba vyvinout dostatečně účinné ale zároveň šetrné metody, jak se s nimi vypořádat. Ideálním řešením je fytoremediace, ale ta je v případě radionuklidů teprve na začátku (Vandenhove, 2013). Proto je třeba sbírat další poznatky a informace o příjmu, translokaci a působení uranu v rostlinách, aby se dal využít plný potenciál této metody.

Prozatím byla většina pokusů prováděno ve sklenících nebo v hydroponickcýh podmínkách. Výsledky těchto pokusů se ale drasticky liší od výsledků pokusů prováděných venku, v terénu (Viehweger & Geipel, 2010), kde do celého procesu fytoremediace zasahuje velké množství faktorů.

Příjem uranu je ovlivňován mnoha faktory. Mezi ty nejzásadnější patří samotná rostlina – to, v jakém množství bude uran přijat je tím zásadně ovlivněno. *N. tabacum* se prozatím jeví jako jeden z nejvhodnějších kandidátů pro využití při fytoremediaci díky jeho vysoké schopnosti (oproti dalším sledovaným rostlinám) translokovat uran do prýtu (Stojanovic et al., 2012). Dalším vhodným kandidátem by mohl být P. vulgaris, který má oproti většině rostlin, na které uran působí toxicky již při 100 μM koncentraci, tuto hranici přibližně desetinásobně posunutou (Vandenhove et al., 2006).

Dalším faktorem je ligand, který je na uran navázaný. Bylo mnohokrát pozorováno, že uran ochotně tvoří s anorganickým fosfátem stabilní U-P komplexy. S těmi si pak již rostliny neumí poradit a dochází k fosfátovému hladovění (Ebbs et al., 1998; Laurette et al., 2011b; Misson et al., 2009; Soudek et al., 2011; Tailliez et al., 2013; Vanhoudt et al., 2011b). K tomuto jevu ale nedochází jen v případě fosfátu, tvorba stabilních komplexů byla pozorována i u síry, vápníku, hořčíku a manganu (Vanhoudt et al., 2011b). Na druhou stranu U-P komplexy již nejsou toxické, rostliny pěstované v médiu s přídavkem fosfátu prospívaly a rostly (Misson et al., 2009; Tailliez et al., 2013; Vanhoudt et al., 2008). Pro zabránění většině toxických účinků na rostlině pěstované ve 100 μM koncetraci uranu staačilo 25 μM koncentrace fosfátu (Vanhoudt et al., 2008).

Naopak vazba na některé nízkomolekulární organické kyseliny příjem uranu výrazně umocní. Jako nejlepší chelator se ze mně dostupných informací jeví kyselina citronová. Při

pokusech měla v rámci příjmu uranu nejlepší výsledky, není toxická a cenově je méně náročná než ostatní zkoumané nízkomolekulární kyseliny (Ebbs et al., 1998; Jagetiya & Sharma, 2013; Laurette et al., 2012a; Mihalik et al., 2012; Sevostianova et al., 2010; Tailliez et al., 2013). Bylo dokonce pozorováno, že kyselina citronová zabraňuje tvorbě U-P komplexů (Laurette et al., 2012b)

Dalším důležitým faktorem ovlivňující příjem uranu rostlinami je pH. Některé rostliny si dokonce během evoluce vyvinuly tzv. klastrové kořeny exsudující citrát za cílem usnadnění solubilizace kovů, zejména železa, ze substrátu. Citrát ale neumocňuje jen příjem uranu; umocňuje i jeho translokaci do prýtu (Ebbs et al., 1998; Mihalik et al., 2012; Talliez et al., 2013). Naproti tomu má komplexace uranu s fosfátem obdobně drasticky omezující účinky pro translokaci jako pro příjem uranu.

Jak již bylo několikrát řečeno, uran je toxický. Byly sice při velmi nízkých koncentracích uranu zaznamenány pozitivní reakce rostlin, hormeze, ale jakmile množství naakumulovaného uranu překročilo určitou mez, působil výhradně toxicky. Rostliny přestávaly růst, docházelo ke snížení čerstvé hmotnosti i sušiny (oproti kontrolním rostlinám), ztrátě turgoru a roztažnosti buněčné stěny. Zároveň byl pozorován výrazný oxidativní stres způsobený chemotoxicitou uranu. Docházelo k tvorbě volných kyslíkových radikálů, porušení fotosyntézy a některých metabolických drah. Proti tomu se rostliny bránily dvěma různými cestami – enzymatickou a neenzymatickou. Enzymatická cesta je výrazně lépe prozkoumaná, proto jsem se jí v této práci věnovala. Obecně lze říci, že je reakce v listech oproti kořenům mírně opožděná v důsledku postupné translokace uranu do prýtu. Také se v listech uplatňují jiné enzymy než kořenech, například lipoxygenáza 1 se uplatňuje v boji proti reaktivním kyslíkovým radikálům v kořenech, kdežto lipoxygenáza 2 v listech (Vanhoudt et al., 2011a).

Co se týče působení uranu na fotosyntézu, při vystavení rostlin nízkým koncentracím uranu (u A. thaliana 5-10 μM) dochází ke zvýšení obsahu fotosyntetických pigmentů (Saenen et al., 2014; Horemans et al., 2015). Myslím si, že to souvisí s reakcí vedoucí ke zvýšení kapacity fotosyntézy za účelem získání energie pro náročné detoxifikační mechanismy pro vyrovnání se s oxidativním stresem. Při vystaven vyšším koncentracím uranu pak ale dochází ke snížení obsahu fotosyntetických pigmentů (Jagetiya & Purohit, 2006; Soudek at al., 2014; Vanhoudt et al., 2014). Je možné, že toto snížení je zapříčiněno sníženou syntézou chlorofylu v důsledku nahrazení centrálního hoečnatého atomu chlorofylu atomem uranu (Lábusová, 2014 cit. Podle Jain & Aery, 1997).

Působení uranu na rostliny je předmětem studia, stále však nemáme komplexní a ucelenou informaci, jak přesně je uran přijímán, jakým mechanismem je translokován po rostlině a jak přesně v ní působí. Bez těchto informací nebude možné plně rozvinout potenciál fytoremediačních technik v boji proti kontaminaci uranem. Bohužel k těmto kontaminacím nejspíše bude v budoucnosti v důsledku antropogenní činnosti dále docházet. Myslím si, že by se tomuto výzkumu mělo dále a hluboce věnovat, protože je to velmi šetrná a neinvazivní metoda dekontaminace.

Tato práce se snažila podat přehled dosavadních znalostí o účincích uranu na rostliny.

7 Seznam zdrojů a použité literatury:

7.1 Literatura

Arnon DI, Stout PR. THE ESSENTIALITY OF CERTAIN ELEMENTS IN MINUTE QUANTITY FOR PLANTS WITH SPECIAL REFERENCE TO COPPER. Plant Physiology 1939; 14: 371-375.

Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. Human & Experimental Toxicology 2002; 21: 91-97.

Cunningham SD, Berti WR, Huang JWW. PHYTOREMEDIATION OF CONTAMINATED SOILS. Trends in Biotechnology 1995; 13: 393-397.

Duquene L, Vandenhove H, Tack F, Meers E, Baeten J, Wannijn J. Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and ryegrass using biodegradable soil amendments. Science of the Total Environment 2009; 407: 1496-1505.

Ebbs SD, Brady DJ, Kochian LV. Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. Journal of Experimental Botany 1998; 49: 1183-1190.

Gavrilescu M, Pavel LV, Cretescu I. Characterization and remediation of soils contaminated with uranium. Journal of Hazardous Materials 2009; 163: 475-510.

Horemans N, Van Hees M, Van Hoeck A, Saenen E, De Meutter T, Nauts R, et al. Uranium and cadmium provoke different oxidative stress responses in Lemna minor L. Plant Biology 2015; 17: 91-100.

Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, et al. Phytoremediation of soil metals. Current Opinion in Biotechnology 1997; 8: 279-284.

Choi J, Choi D, Lee S, Ryu CM, Hwang I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? Trends in Plant Science 2011; 16: 388-394.

Jagetiya B, Sharma A. Optimization of chelators to enhance uranium uptake from tailings for phytoremediation. Chemosphere 2013; 91: 692-696.

Jagetiya BL, Purohit P. Effects of various concentrations of uranium tailings on certain growth and biochemical parameters in sunflower. Biologia 2006; 61: 103-107.

Jain GS, Aery NC. Effect of uranium additions on certain biochemical constituents and uranium accumulation in wheat. Biologia 1997; 52: 599-604. *

Lábusová J. 2014, „Effect of uranium on plant metabolism“. Diplomová práce, katedra experimentální biologie rosltin Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze, Praha, lokalizováno v knihovně

Laurette J, Larue C, Llorens I, Jaillard D, Jouneau P-H, Bourguignon J, et al. Speciation of uranium in plants upon root accumulation and root-to-shoot translocation: A XAS and TEM study. Environmental and Experimental Botany 2012a; 77: 87-95.

Laurette J, Larue C, Mariet C, Brisset F, Khodja H, Bourguignon J, et al. Influence of uranium speciation on its accumulation and translocation in three plant species: Oilseed rape, sunflower and wheat. Environmental and Experimental Botany 2012b; 77: 96-107.

Li C-w, Hu N, Ding D-x, Hu J-s, Li G-y, Wang Y-d. Phytoextraction of uranium from contaminated soil by Macleaya cordata before and after application of EDDS and CA. Environmental Science and Pollution Research 2015; 22: 6155-6163.

Lubovská Z. 2015, „Antioxidant enzymes response to abiotic stress. Impact of dereased cytokinin level.“. Diplomová práce, katedra experimentální biologie rosltin Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze, Praha, lokalizováno v knihovně

Mattson MP. Hormesis defined. Ageing Research Reviews 2008; 7: 1-7.

Mihalik J, Henner P, Frelon S, Camilleri V, Fevrier L. Citrate assisted phytoextraction of uranium by sunflowers: Study of fluxes in soils and plants and resulting intra-planta distribution of Fe and U. Environmental and Experimental Botany 2012; 77: 249-258.
Misson J, Henner P, Morello M, Floriani M, Wu TD, Guerquin-Kern JL, et al. Use of phosphate to avoid uranium toxicity in Arabidopsis thaliana leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability. Environmental and Experimental Botany 2009; 67: 353-362.
Mitchell N, Perez-Sanchez D, Thorne MC. A review of the behaviour of U-238 series radionuclides in soils and plants. Journal of Radiological Protection 2013; 33: R17-R48.
Okacova L, Vetchy D, Franc A, Rabiskova M, Kratochvil B. Increasing Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs by Their Modification. Chemicke Listy 2010; 104: 21-26.
Petrova S, Soudek P, Vanek T. Remediation of Uranium Mining Areas in the Czech Republic. Chemicke Listy 2013; 107: 283-291.
Pilon-Smits E. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology 2005; 56: 15-39. – Byl použitý pouze obrázek *
Qi F, Zha Z, Du L, Feng X, Wang D, Zhang D, et al. Impact of mixed low-molecular-weight organic acids on uranium accumulation and distribution in a variant of mustard (Brassica juncea var. tumida). Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 2014; 302: 149-159.
Saenen E, Horemans N, Vanhoudt N, Vandenhove H, Biermans G, Van Hees M, et al. Effects of pH on uranium uptake and oxidative stress responses induced in Arabidopsis thaliana. Environmental Toxicology and Chemistry 2013; 32: 2125-2133.
Saenen E, Horemans N, Vanhoudt N, Varidenhove H, Biermans G, Van Hees M, et al. The pH strongly influences the uranium-induced effects on the photosynthetic apparatus of Arabidopsis thaliana plants. Plant Physiology and Biochemistry 2014; 82: 254-261.
Sevostianova E, Lindemann WC, Ulery AL, Remmenga MD. Plant Uptake of Depleted Uranium from Manure-Amended and Citrate Treated Soil. International Journal of Phytoremediation 2010; 12: 550-561.
Singh KP. Uranium uptake by plants. Current Science 1997; 73: 532-535.
Soudek P, Petrova S, Benesova D, Dvorakova M, Vanek T. Uranium uptake by hydroponically cultivated crop plants. Journal of Environmental Radioactivity 2011; 102: 598-604.
Soudek P, Petrova S, Benesova D, Kotyza J, Vanek T. Fytoremediation and possibilities of increasing its effectivity. Chemicke Listy 2008; 102: 346-352.
Soudek P, Petrova S, Buzek M, Lhotsky O, Vanek T. Uranium uptake in Nicotiana sp under hydroponic conditions. Journal of Geochemical Exploration 2014; 142: 130-137.
Stojanovic MD, Mihajlovic ML, Milojkovic JV, Lopicic ZR, Adamovic M, Stankovic S. Efficient phytoremediation of uranium mine tailings by tobacco. Environmental Chemistry Letters 2012; 10: 377-381.
Straczek A, Wannijn J, Van Hees M, Thijs H, Thiry Y. Tolerance of hairy roots of carrots to U chronic exposure in a standardized in vitro device. Environmental and Experimental Botany 2009; 65: 82-89.
Tailliez A, Pierrisnard S, Camilleri V, Keller C, Henner P. Do rhizospheric processes linked to P nutrition participate in U absorption by Lupinus albus grown in hydroponics? Journal of Environmental Radioactivity 2013; 124: 255-265.
Tome FV, Rodriguez PB, Lozano JC. The ability of Helianthus annuus L. and Brassica juncea to uptake and translocate natural uranium and Ra-226 under different milieu conditions. Chemosphere 2009; 74: 293-300.

Vandenhove H, Cuypers A, Van Hees M, Koppen G, Wannijn J. Oxidative stress reactions induced in beans (Phaseolus vulgaris) following exposure to uranium. Plant Physiology and Biochemistry 2006; 44: 795-805.

Vandenhove H. Phytoremediation options for radioactively contaminated sites evaluated. Annals of Nuclear Energy 2013; 62: 596-606.

Vanhoudt N, Cuypers A, Horemans N, Remans T, Opdenakker K, Smeets K, et al. Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in Arabidopsis thaliana seedlings. Part II: responses in the leaves and general conclusions. Journal of Environmental Radioactivity 2011a; 102: 638-645.

Vanhoudt N, Horemans N, Biermans G, Saenen E, Wannijn J, Nauts R, et al. Uranium affects photosynthetic parameters in Arabidopsis thaliana. Environmental and Experimental Botany 2014; 97: 22-29.

Vanhoudt N, Vandenhove H, Horemans N, Bello DM, Van Hees M, Wannijn J, et al. URANIUM INDUCED EFFECTS ON DEVELOPMENT AND MINERAL NUTRITION OF ARABIDOPSIS THALIANA. Journal of Plant Nutrition 2011b; 34: 1940-1956.

Vanhoudt N, Vandenhove H, Horemans N, Remans T, Opdenakker K, Smeets K, et al. Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in Arabidopsis thaliana seedlings. Part I: responses in the roots. Journal of Environmental Radioactivity 2011c; 102: 630-637.

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 2008; 46: 987-996.

Viehweger K, Geipel G. Uranium accumulation and tolerance in Arabidopsis halleri under native versus hydroponic conditions. Environmental and Experimental Botany 2010; 69: 39-46.

* převzaté citace

7.2 Internetové zdroje

http://aob.oxfordjournals.org/content/105/4/F1.medium.gif

http://old.vscht.cz/anl/dolensky/supramol/soubory/2013_SuprChem_BD_Chelation.pdf

http://orion.chemi.muni.cz/virtuallab/prehledy/imac.htm

http://unm.lf1.cuni.cz/vyuka/slovnicek_verze_120106.pdf

http://web.ead.anl.gov/uranium/guide/ucompound/health/index.cfm

http://www.geology.cz/extranet/publikace/online/surovinove-zdroje/SUROVINOVE-ZDROJE-CESKE-REPUBLIKY-2014.pdf

http://www.ujv.cz/cz/pro-verejnost/slovnik-pojmu/58-chelatace

http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chel%C3%A1ty