

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijný program: Biologie

Studijný obor: Biologie



**Lukáš Gímeš**

Toxicita a hyperakumulace arsenu v rostlinách a potenciál využití  
v remediacích

Arsenic toxicity and hyperaccumulation in plants and their potential  
use in phytoremediation

**Bakalářská práce**

Školitel: **RNDr. Petra Mašková, Ph.D.**

Konzultant: **doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.**

**Praha, 2020**

## Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

## Poďakovanie

V prvom rade chcem poďakovať svojej školiteľke RNDr. Petre Maškovej, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu a trpezlivosť, ktoré mi pomohli pri písaní tejto práce.

V Prahe, 14.8.2020

Podpis

## Abstrakt

Arzén sa radí medzi ťažké polokovy. V životnom prostredí sa nachádza v malom množstve prirodzene. Ľudskou činnosťou sa množstvo arzénu v pôde neustále zvyšuje. Zvyšujúca sa kontaminácia pôdy arzénom spôsobuje závažné zdravotné problémy zvieratám aj ľuďom. Nemalé problémy spôsobuje svojou toxicitou aj rastlinám. Arzén negatívne ovplyvňuje celú radu procesov v rastlinnom tele ako napríklad oxidatívny stres, metabolizmus dôležitých makromolekúl. Medzi najviac zasiahnuté fyziologické procesy patrí fotosyntéza. Úzko spojené s fotosyntézou sú rastové vlastnosti rastlín. Pre negatívne vplyvy na mnohé biochemické, fyziologické a morfológické procesy v rastlinnom tele musíme pochopiť príjem, translokáciu a detoxikáciu arzénu v rastlinnom tele. Hyperakumulátory arzénu sú rastliny, ktoré v sebe dokážu akumulovať rádovo vyššie koncentrácie As a lepšie zvládajú fytotoxicitu tohto kontaminantu ako nehyperakumulujúce rastliny. Hyperakumulácia ťažkých kovov je spojená so zmenou fyziologických vlastností rastlín. Spoločnou vlastnosťou hyperakumulátorov je, že viac akumulujú kovy v nadzemných častiach ako v koreňoch. Tieto poznatky nám pomôžu aj pri odstraňovaní tohto kontaminantu z pôd pomocou fytoremediačných techník, ktoré využívajú práve hyperakumulujúce rastliny. Fytoremediačné techniky majú veľa výhod ako napríklad menšie finančné náklady, udržateľnosť, kladný vzťah verejnosti k zeleni, avšak aj veľa nevýhod. K najvýraznejšej nevýhode patrí čas, ktorý je potrebný na vyčistenie substrátu, ale k prekážkam pri použití fytoremediačných techník napríklad patrí vytváranie malej biomasy, úzka ekologická nika hyperakumulátorov. Nádejnou alternatívou k hľadaniu vhodných prirodzených hyperakumulátorov môžu byť geneticky modifikované rastliny, ktoré by mali výhodné vlastnosti a tým by zlepšili efektívnosť fytoremediácií.

## Kľúčové slová

Arzén, Detoxikácia, Fotosyntéza, Fytoremediácia, Fytotoxicita, Hyperakumulácia, Príjem, Transport

## Abstract

Arsenic is classified as a heavy metalloid. Small amounts of arsenic can be found in the environment naturally, but human activity constantly increases the amount of arsenic in the soil. Increasing arsenic contamination of the soil causes serious health problems for both animals and humans. Due to its toxicity, it can also cause considerable problems for plants. Arsenic negatively affects a number of processes in the body of plants, such as oxidative stress or the metabolism of important macromolecules. Photosynthesis is a physiological process that is the most affected by arsenic toxicity. Closely related to photosynthesis are the growth properties of plants. Negative effects that arsenic has on many biochemical, physiological and morphological processes in the plant body, we must understand the uptake, translocation and detoxification of arsenic in the plant body. Arsenic hyperaccumulators are plants that can accumulate orders of magnitude higher concentrations of As and better manage the phytotoxicity of this contaminant than non-hyperaccumulating plants. Hyperaccumulation of heavy metals is associated with changes in the physiological properties of plants. A common characteristic of hyperaccumulators is that they can accumulate the higher concentrations of metals they in the aboveground parts than in their roots. This knowledge can also help with removing this contaminant from soils by using phytoremediation techniques that use hyperaccumulating plants. Phytoremediation techniques have many advantages such as lower financial costs, sustainability, a positive public attitude towards greenery, but on the other hand there are also many disadvantages. The most significant disadvantage is the time required to clean the substrate, but an obstacle to the use of phytoremediation techniques is the formation of small biomass, a narrow ecological niche of hyperaccumulators. A promising alternative to the search for suitable natural hyperaccumulators may be genetically modified plants that have beneficial properties and thus improve the efficiency of phytoremediation.

## Key words

Arsenic, Detoxification, Photosynthesis, Phytoremediation, Phytotoxicity, Hyperaccumulation, Uptake, Transport

## Obsah

Zoznam skratiek.....	1
1. Úvod .....	2
2. Ťažké kovy a arzén.....	3
2.1. Zdroje ťažkých kovov .....	3
2.2. Arzén (As) .....	3
3. Príjem a translokácia arzénu rastlinami .....	4
3.1 Príjem arzénu .....	4
3.2 Translokácia As .....	5
3.2.1 Xylémová translokácia .....	5
3.2.2 Floémová translokácia .....	6
4. Detoxikácia As .....	6
5. Fytotoxicita ťažkých kovov a As.....	8
5.1 Efekt As na fotosyntézu .....	9
5.2.1 Vplyv As na fotosystémy .....	10
5.2.2 Vplyv As na fotosyntetické pigmenty .....	10
5.2.3 Vplyv As na syntézu ATP a NADPH a zníženie fixácie CO <sub>2</sub> .....	10
5.2.4 Vplyv As na translokáciu prvkov dôležitých pre fotosyntézu .....	11
5.3 Efekt As na klíčivosť semien rastlín .....	11
5.4. Efekt As na rast biomasy .....	11
6. Hyperakumulátory.....	12
6.1 Zmeny vo fyziologických vlastnostiach hyperakumulátorov.....	13
6.2 Hyperakumulátory As.....	14
7. Fytoremediácia .....	15
7.1. Využitie hyperakumulátorov As pri fytoremediácii znečistených pôd.....	17
7.1.1 Fytoextrakcia As .....	17
7.1.2. Rhizofiltrácia As .....	18
7.1.3. Likvidácia As po fytoremediácii .....	19
7.2 Využitie geneticky modifikovaných rastlín pre hyperakumuláciu/fytoremediáciu As .....	19
8. Záver .....	21
Literatúra .....	22

## Zoznam skratiek

ABC transportér - ATP Binding Cassette transportér  
As<sup>III</sup> - arzenit  
As<sup>III</sup>- PC komplex- arzenit-fytochelatinový komplex  
As<sup>V</sup> – arzenát  
AR- arzenátreduktáza  
BF- The bioconcentration factor  
DAP- diamóniumfosfát  
DMA- dimetylarsínová kyselina  
DSMA - metylarsonát disodný  
ETR – elektrotransportný reťazec  
GSH- glutation  
Chl a- chlorofylu a  
Chl b- chlorofylu b  
K<sub>M</sub>- Michaelisova konštanta  
MMA- monometylarsónová kyselina  
MSMA (metylaronát sodný)  
NIPs- nodulin 26-like intrinsic proteins  
PC- fytochelatin  
PCS - fytochelatínsyntáza  
Pht1- fosfátový transportér 1  
PSII- fotosystém II  
RUBISCO - Ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza  
ROS- reaktívne formy kyslíka  
TIPs- tonoplast intrinsic proteins  
V<sub>MAX</sub>- maximálna rýchlosť  
WT- wild type

## 1. Úvod

Arzén je toxický polokov, ktorý sa do prírody dostáva prirodzenými geologickými procesmi ako aj ľudskou činnosťou (napr. využívaný ako herbicíd a insekticíd), ktorá spôsobuje neustále sa zvyšujúcu kontamináciu prostredia. Cez rastliny sa dostáva do potravinového reťazca čím spôsobuje závažné zdravotné problémy ľuďom najmä v Ázii, ale aj v Amerike či Európe. V prostredí sa nachádza v rôznych formách, anorganických aj organických. Kvôli zdravotným problémom, ktoré arzén spôsobuje je nutné porozumieť faktorom, ktoré ovplyvňujú príjem, translokáciu a detoxifikáciu rôznych foriem As. Príjem As rastlinou je špecifický proces, ktorý využíva rôzne rastlinné transportéry a závisí na forme prijatého As. Po prijatí As rastlinou sa jeho cesta nekončí, pretože je následne xylémovou alebo floémovou translokáciou premiestňovaný do nadzemných častí rastlín, čím sa dostáva do jedlých častí rastlín.

Rastliny sa vedia v určitej miere vysporiadať s kontaminovanou pôdou vďaka svojim detoxifikačným mechanizmom. Pri zlyhaní detoxifikačných procesov rastliny nastáva fytotoxicita As, ktorá spôsobuje veľké hospodárske škody. As negatívne pôsobí na rôzne biochemické a fyziologické procesy, ktoré na záver vyústia v zníženie celkovej biomasy alebo výnosov hospodárskych rastlín. Medzi najviac zasiahnuté fyziologické procesy patrí fytosyntéza a to na všetkých úrovniach. Avšak fytotoxicita As závisí od mnoho faktorov, napr. forma As, vek a druh rastliny. Niektoré druhy rastlín zvládajú stres vyvolaný As lepšie ako iné, a dokonca tento polokov dokážu akumulovať v rádovo vyšších koncentráciách. Tieto rastliny sa nazývajú hyperakumulátory As. Táto zaujímavá schopnosť je spojená so zmenou celej škály fyziologických procesov (Krämer 2010). Všetky známe hyperakumulátory patria do čelade Pteridaceae. Prvý známy hyperakumulátor As je *Pteris vittata* (Ma et al. 2001).

Pre neustále zvyšujúcu sa hladinu tohto polokovu v prostredí je dôležité vymyslieť udržateľný a efektívny spôsob sanácie takto kontaminovaného areálu. Medzi vhodných kandidátov na šetrný spôsob čistenia pôdy, spodnej alebo povrchovej vody patrí fytoremediácia. Pod pojmom fytoremediácia sú zahrnuté metódy, ktoré využívajú rastlinné hyperakumulátory na odstránenie, redukciu, degradáciu alebo imobilizáciu nebezpečných kontaminantov zo substrátu. Najefektívnejšie a najviac preskúmané patria fytostabilizácia, fytovolatilizácia, rhizofilizácia, fytoextrakcia. Fytoremediálne techniky majú veľa výhod. Najdôležitejšia výhoda je to, že je to pomerne lacná alternatíva k drahým konvenčným technikám remediácie- pomocou ťažkej techniky alebo za použitia chemikálií. Taktiež patrí medzi metódy priateľské ku životnému prostrediu. V neposlednej rade medzi významné výhody patrí estetická stránka fytoremediálnych techník, z prostredia, ktoré je vnímané ako znečistené a toxické sa stane zelené miesto plné rastlín. Tento efekt má pozitívny vplyv na vnímanie lokality očami verejnosti. Na druhej strane fytoremediálne techniky majú aj nevýhody. Najväčšia nevýhoda je čas, ktorý je potrebný na vyčistenie substrátu (Vara Prasad and de Oliveira Freitas 2003). Na fytoremediálne techniky sa využívajú hyperakumulujúce rastliny. Avšak prirodzené hyperakumulátory majú veľa negatív (úzky areál rozšírenia, malá biomasa, pomalý rast, akumulácia konataminantu do jedlých častí rastlín, atď.), ktoré znižujú efektívnosť fytoremediácie. Nádejnou stratégiou ako sa vysporiadať s nevýhodami prirodzených hyperakumulátorov je vytváranie transgénnych rastlín, ktoré by tieto nedostatky minimalizovali a tým by zvyšovali efektívnosť fytoremediácie.

## 2. Ťažké kovy a arzén

Ťažké kovy sú v literatúre definované podľa viacerých kritérií. V prvom rade ich môžeme definovať podľa hmotnosti. Ako zhrnul (Duffus 2002), rôzni autori používajú definíciu ťažkých kovov na základe hustoty odlišne, a to v rozmedzí 3,5-7 g.cm<sup>-3</sup>. Tieto chemické parametre sú často v biológii zanedbávané a dôležitejšia charakteristika pre biológov je toxicita a chemické špecifikácie prvkov. Každý kov/polokov môže byť považovaný za kontaminant ak sa vyskytuje tam, kde je nežiadúci alebo jeho forma či vysoká koncentrácia spôsobuje poškodenie životného prostredia, má škodlivý efekt na organizmy. Medzi ťažké kovy a polokovy sú považované napr. olovo (Pb), kadmium (Cd), ortuť (Hg), arzén (As), chróm (Cr), striebro (Ag), hliník (Al), ale aj niektoré esenciálne prvky vo vysokých koncentráciách ako meď (Cu), selén (Se), nikel (Ni), zinok (Zn), kobalt (Co), mangán (Mn), molybdén (Mo), a rádioaktívne prvky cézium (Cs), stroncium (Sr), and uránium (U) (Singh et al. 2011).

### 2.1. Zdroje ťažkých kovov

V prehľadovej literatúre (Nagajyoti et al. 2010) boli zhrnuté jednotlivé prírodné príčiny znečistenia prostredia ťažkými kovmi. Koncentrácia ťažkých kovov v pôde závisí na podloží, environmentálnych podmienkach prostredia a zvetrávaní hornín. Ďalšie dôležité zdroje ťažkých kovov sú piesočný prach, napr. zo Sahary, ktorý obsahuje vysoké množstvo Fe. Sopečné erupcie môžu mať taktiež vysoký podiel na koncentráciu niektorých ťažkých kovov, napr. Cd, Zn, Hg. Morské aerosóly, ktoré sa dostávajú na zemský povrch v podobe dažďov, sú zas zásobárňou Cu a Mn. Pri požiaroch sa uvoľňujú prchavé kovy, ako Hg a Se, ktoré sú súčasťou uhlikatých látok. Taktiež pri rozklade vegetácie a tel ostatných organizmov sa do prostredia emitujú ťažké kovy. Ťažké kovy sa teda do prostredia dostávajú z prírodných zdrojov, avšak autori sa nezhodujú akým spôsobom a v akých množstvách sa z týchto zdrojov dostávajú do ekosystému.

Ľudská aktivita je tiež veľkým znečisťovateľom pôdy. Najmä keď sa jedná o priemysel a poľnohospodárstvo. V poľnohospodárstve používame pesticídy a hnojivá, ktoré sú zdrojom ťažkých kovov a tie sa cez ne dostávajú do pôdy. Hnojivom (anorganickým alebo organickým) sa do pôdy dostávajú najčastejšie As, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Mn, Cu a Co, Ni. Koncentrácia týchto kovov v hnojivách nie je moc vysoká, ale ich opakovanou aplikáciou môže dochádzať k akumulácii daných ťažkých kovov v poľnohospodárskej pôde, čo je nebezpečné pre porast. Ďalším zdrojom ťažkých kovov sú pesticídy, ktoré obsahujú ťažké kovy ako Cu, As, Pb, Zn, Fe, Mn a Hg. Hutnícky priemysel a s ním spojené odvetia (napr. ťažba kovov) sú zdrojom ťažkých kovov v pôde po celom svete. V súčasnosti sa do pôdy týmto spôsobom dostávajú vo vysokých koncentráciách As, Cd, Fe, Cu, Pb, Sn, Zn (Nagajyoti et al. 2010).

### 2.2. Arzén (As)

Arzén je polokov, ktorý je všadeprítomný v prostredí. Do životného prostredia sa dostáva geologickými procesmi, ale aj ľudskou aktivitou. As je z pôdy absorbovaný rastlinami a dostáva sa do jedlých častí rastlín (napr. ryžové zrná), týmto spôsobom sa dostáva do potravinového reťazca a môže spôsobovať závažné ochorenia vrátane tvorby karcinómu (napr. Biswas et al. 2020). Arzén v pôde sa vyskytuje v 3 hlavných formách, ktoré sú dostupné pre rastliny a to As<sup>V</sup> (arzenát), As<sup>III</sup> (arzenit) a metylované formy As (Li et al. 2016).

V zemskej kôre a teda v pôde sa nachádza viac ako 200 minerálov, ktoré obsahujú arzén v rôznych formách, ale len malé % z nich sa vyskytuje v prírode vo väčších množstvách.



Geologickými procesmi (napr. oxidácia minerálov obsahujúcich As) sa do podzemných vôd arzén uvoľňuje vo veľmi malom množstve a len v niektorých geografických oblastiach (napr. Bangladéš). Okolo 1/3 arzénu vo vzduchu je prirodzeného pôvodu. Hlavným zdrojom arzénu je sopečná činnosť (Abernathy et al. 2001).

Ľudská činnosť ako ťažba rôznych kovov a poľnohospodárska činnosť stojí za znečistením pôdy arzénom. V sedemdesiatych rokoch 20. storočia boli hlavnými producentmi arzénu USA, ďalej Mexiko, Švédsko, Francúzsko v tomto poradí. Arzén vo forme oxidu arzenitého ( $As_2O_3$ ) je veľmi dôležitý pre komerčné účely, je základom insekticídov, herbicídov, ochranných prostriedkov na drevo a dokonca aj liekov. V minulosti sa ročne vyrobilo okolo 50 000 ton arzénu a tiež vzniká ako vedľajší produkt pri tavení medenej, olovene a zinkovej rudy (Nelson 1977). Veľké množstvo arzénu v rôznych podobách sa dostávalo do pôdy prostredníctvom poľnohospodárstva, pretože v minulosti sa zlúčeniny As hojne využívali ako insekticídy  $Ca_3AsO_4$ ,  $H_3AsO_4$ , MSMA (metylarsonát sodný), DSMA (metylarsonát disodný), atď. a herbicídy ( $NaAsO_2$ ) (Mandal and Suzuki 2002).

### 3. Príjem a translokácia arzénu rastlinami

#### 3.1 Príjem arzénu

Mechanizmus príjmu As závisí od jeho rôznych foriem.  $As^V$  sa do rastliny dostáva pomocou fosfátových transportérov z rodiny fosfátových transportérov 1 (Pht1) (napr. Shin et al. 2004; Catarecha et al. 2007), ktorých je v rastlinách veľké množstvo, najmä v koreňoch, ktoré prijímajú fosfát z pôdy (Zhao et al. 2009). A to pretože má štruktúrnu analógiu k fosfátu. Úloha týchto transportérov pri prijíme  $As^V$  bola preukázaná pomocou mutantných foriem *A. thaliana*. Dvojitý mutant vo fosfátových transportéroch *pht1;1D4D* bol signifikantne rezistentný oproti kontrolnej netransgénnej rastline (wild type -WT), pretože rast jeho biomasy v 200  $\mu M$   $As^V$  oproti kontrole bol zredukovaný o 50%, kdežto pri WT rast biomasy bol zredukovaný o 94%. Tieto výsledky nám ukazujú, že tieto transportéry majú vysoký podiel na prijíme  $As^V$  rastlinami (Shin et al. 2004).

$As^{III}$  sa dostáva do rastlín viacerými mechanizmami cez rôzne transportéry, ktoré sú zhrnuté v review od Sourí et al. (2017). Medzi tieto transportéry patria proteíny z rodiny aquaporínov - nodulin 26-like intrinsic proteins (NIPs). NIP1;1, NIP1;2, NIP3;1, NIP5;1, NIP6;1, and NIP7;1 sú zodpovedné za príjem a transport kyseliny arzenitej (neutrálne forma  $As^{III}$ ) v koreňoch *A. thaliana* (zhrnuté napr. v Sourí et al. 2017). Mutantné rastliny *A. thaliana* s knock-outovaným génom *NIP3;1* vykazovali vyššiu toleranciu voči stresu, ktorý bol zapríčinený  $As^{III}$ . Táto tolerancia bola spôsobená tým, že takéto mutantné rastliny neprijímali  $As^{III}$ , čo potvrdzujú výsledky, že *nip3;1* mutanti mali v nadzemných častiach oveľa nižší obsah  $As^{III}$  ako WT rastliny (zníženie o 44% pri 48 hodinovom ošetrovaní  $As^{III}$  a 42% pri 24 hodinovom ošetrovaní  $As^{III}$ ). V koreňoch pri 24 hodinovom ošetrovaní došlo k zníženiu koncentrácie  $As^{III}$ , ale rozdiel medzi WT a mutantnými rastlinami pri 48 hodinovom ošetrovaní nebol signifikantný, čo nám naznačuje dvojitú úlohu *NIP3;1*, pri prijíme  $As^{III}$  z média, tak aj pri translokácii z koreňov do nadzemných častí rastlín (Xu et al. 2015). Ďalšie výsledky nám ukazujú, že translokačný faktor bol 0,142–0,153 vo WT rastlinách bol znížený na 0,078–0,108 v *nip3;1* po 48h ošetrovaní  $As^{III}$ . Tieto výsledky nám naznačujú, že strata *NIP3;1* vedie k zníženiu obsahu  $As^{III}$ , a teda, že je zodpovedný za príjem  $As^{III}$  z média (Xu et al. 2015). Ďalšia štúdia Ma et al. (2008) naznačuje účasť NIP proteínov pre príjem  $As^{III}$  rastlinami. V tejto štúdii sa zamerali na transportér Lsi1 v *O. sativa*, ktorý je transportér pre kyselinu kremičitú. Tento transportér bol vybraný kvôli tomu, že kyselina kremičitá má podobné štruktúrne a chemické vlastnosti ako

kyselina arzenitá (neutrálna forma  $As^{III}$ ). Mutanti v *Lsi1* mali koncentráciu  $As^{III}$  zníženú o 53% v koreňoch a 71% v nadzemných častiach rastliny oproti kontrolným rastlinám. Tieto výsledky nám teda naznačujú úlohu *Lsi1* pri prijímaní  $As^{III}$  z média. V tejto štúdii ďalej testovali aj iný transportér *Lsi6*, ktorý síce vykazoval schopnosť transportu  $As^{III}$  do rastliny, ale nehral veľkú rolu, pravdepodobne pretože nie je dostatočne exprimovaný. Tento výsledok nám naznačuje, že hlavnú úlohu pri prijímaní  $As^{III}$  v rastlinách ryže má *Lsi1*. V papradi *P. vittata* môžu byť zapojené do prijímania  $As^{III}$  aquaporin tonoplast intrinsic proteins (TIPs), jeden z nich je *PvTIP4;1* (He et al. 2016). V mutantných rastlinách *A. thaliana* s *PvTIP4;1* bola miera klíčenia znížená oproti WT rastlinám a taktiež rast nadzemných častí rastlín a koreňov bol znížený. Ďalej v tejto štúdii autori ukázali, že v koreňoch *P. vittata* dochádza k extrémne vysokej expresii *PvTIP4;1*, čo nám naznačuje, že sa môže jednať o spôsob prijímania  $As^{III}$  z média v *P. vittata* (He et al. 2016).

Do rastlín sa taktiež môžu dostávať aj metylované formy As napr. DMA (dimetylarsínová kyselina) a MMA (monometylarsónová kyselina), ktoré vznikajú pôsobením mikroorganizmov v pôde. Tieto formy As sa nachádzajú v pôde v menších množstvách ako anorganické formy As ( $As^{III}$  a  $As^V$ ). Rastliny ich prijímajú omnoho menej ako anorganické formy As. Mechanizmus prijímania metylovaných foriem As nie je dostatočne preskúmaný (zhrnuté v Sourí et al. 2017).

### 3.2 Translokácia As

Cesta arzenu sa prijímaním do koreňa nekončí, transportuje sa symplastom, prípadne apoplastom do stredu koreňa a vodivými pletivami do nadzemných častí rastlín.

#### 3.2.1 Xylémová translokácia

Schopnosť naložiť As do xylému má významný vplyv na akumuláciu As v nadzemných častiach rastlín. V ryži boli identifikované membránové proteíny, ktoré sú zodpovedné za nakladanie As do xylému (Li et al. 2016).

Transportér v rastlinách ryže, ktorý je pravdepodobne zodpovedný za nakladanie  $As^{III}$  do xylému je transportér kyseliny kremičitej *OsLsi2*. Na to prišli autori štúdie Ma et al. (2008) vďaka knockoutovaniu génu pre *Lsi2*. V mutantných rastlinách (bez *Lsi2*) bola koncentrácia arzenitu v nadzemných častiach rastliny nižšia oproti WT rastlinám o 75%. Na druhej strane mutanty neboli defektné v prijímaní  $As^{III}$  z média (na rozdiel od mutantov v *Lsi1* (Ma et al. 2008)). Ďalšie výsledky tejto štúdie naznačujú, že transportér *Lsi2* je zodpovedný za nakladanie  $As^{III}$  do xylému, pretože koncentrácia  $As^{III}$  v xylémovej šťave bola nižšia o 73%. Veľký problém je, že do zŕn ryže sa takto akumuluje veľké množstvo As, ktoré sa týmto spôsobom dostáva do potravinového reťazca a spôsobuje rôzne patogenity. Preto je dôležité prísť na mechanizmus akumulácie As do zŕn. Výsledky Ma et al. (2008), naznačujú, že *Lsi2* je zodpovedný za vykladanie As z xylému a teda aj za akumuláciu  $As^{III}$  do zŕn ryže, pretože mutanti bez *Lsi2* mali koncentráciu  $As^{III}$  v zŕnách zníženú o viac ako polovicu oproti WT rastlinám.

Transportnú dráhu pre fosfát pravdepodobne rastliny ryže využívajú pre translokáciu  $As^V$  z koreňov do nadzemných častí rastliny (Wu et al. 2011). Rastlinné línie, ktoré nadmerne exprimovali *PHR2* (transcription factor for phosphate starvation response2) vykazovali zvýšenú xylémovú translokáciu  $As^V$  aj  $As^{III}$ . V týchto mutantných rastlinách (s nadmernou expresiou *PHR2*) bola zvýšená aj expresia *OsPT8* (fosfátový transportér), čo naznačuje, že expresia *OsPT8* je regulovaná *PHR2*. Rastliny s nadmerne exprimovaným *OsPT8* mali výrazne vyššiu koncentráciu  $As^V$  (23-násobne pri 2 hodinovej expozícii  $As^V$ ) v xylémovej šťave. Taktiež

sa zvýšila koncentrácia  $As^V$  v nadzemných častiach rastlín z nedetekovateľného množstva na 13% celkového množstva  $As$  v nadzemných častiach rastlín, čo naznačuje, že OsPT8 je zodpovedné za translokáciu  $As^V$  z koreňov do nadzemných častí (Wu et al. 2011). Metylované formy  $As$  (DMA/MMA) sú mobilnejšie ako anorganické formy  $As$  ( $As^{III}/As^V$ ), ale transportéry metylovaných foriem zostávajú nejasné (zhrnuté v Li et al. 2016).

Jednotlivé druhy rastlín sa veľmi výrazne líšia v mobilite  $As$  v xyléme. Táto mobilita je vyjadrená pomerom koncentrácie  $As$  v xylémovej šťave ku koncentrácii  $As$  vo vonkajšom roztoku. V nehyperakumulujúcich rastlinách je tento pomer nižší ako 1, ako pre  $As^V$  aj  $As^{III}$ , a z týchto rastlín má najvyššiu mobilitu ryža (0.49  $As^V$  a 0.56  $As^{III}$ ), pravdepodobne kvôli vysokej expresii Lsi2. Pre uhorku sú tieto hodnoty 0,18  $As^V$  a 0,30  $As^{III}$ . *P. vittata* sa ako hyperakumulátor rádovo líši svojimi hodnotami mobility  $As$  v xyléme, kedy hodnota mobility  $As$  v xyléme je až 73 pre  $As^V$  a 49 pre  $As^{III}$  (Zhao et al. 2009).

### 3.2.2 Floémová translokácia

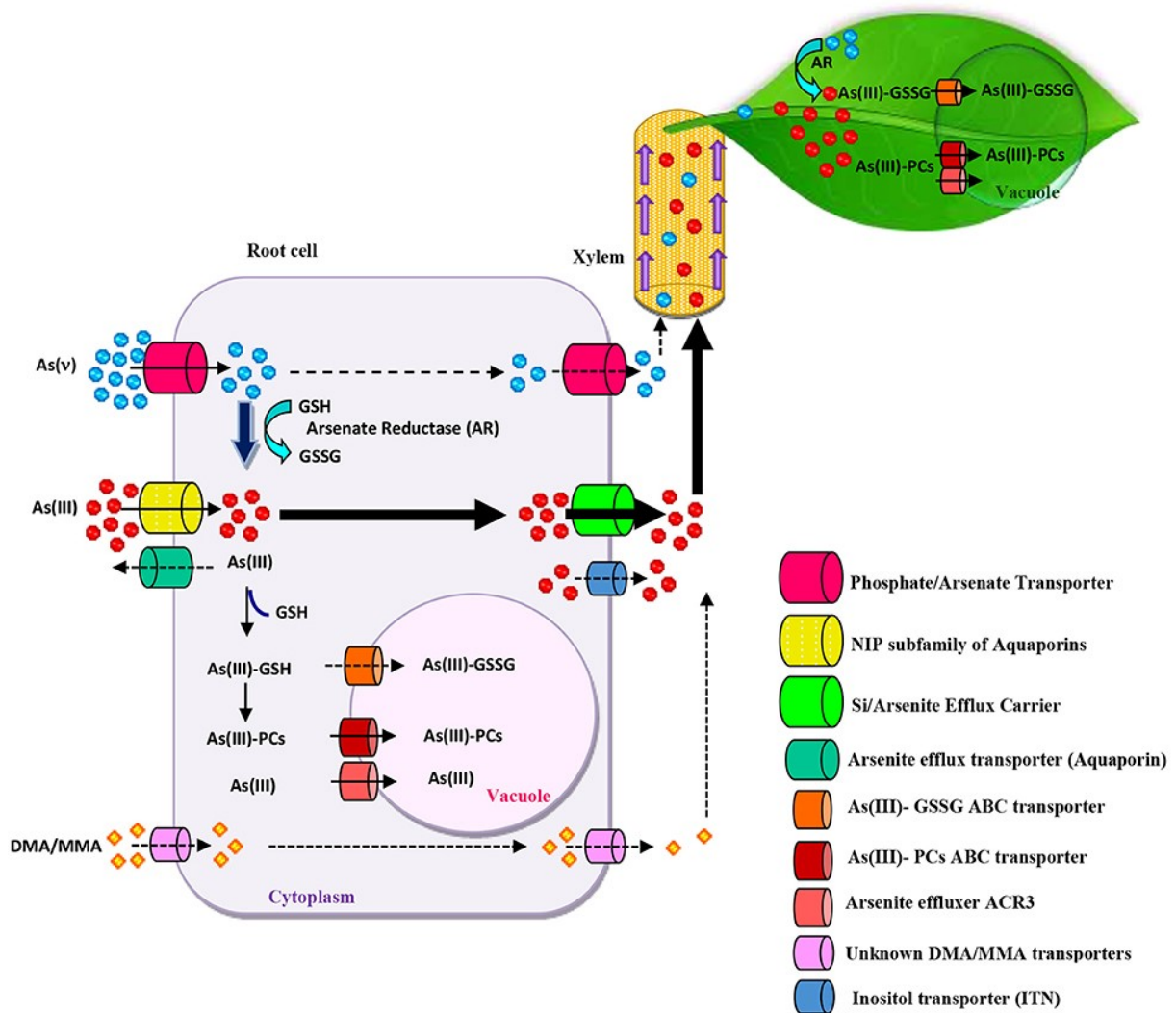
Arzén je pravdepodobne ako minerálne látky, cukry a aminokyseliny prenášaný i floémom z listov do sinkov (napr. zrn) (Li et al. 2016). Ukázalo sa, že v ryži až 90%  $As^{III}$  a 55% DMA je prenášané do zrn floémom (Carey et al. 2010). Právanie  $As^{III}$  a DMA v zrnách ryže je rozdielne, kým  $As^{III}$  sa ukladá do ovariálnej vaskulárnej siete, tak DMA sa šíri vonkajšími časťami zrna a niekedy sa ukladal až do endospermu. Veľmi dôležité je, že žiadne výsledky neukázali, že by sa  $As$  (v rôznych formách) nachádzalo v embryu (Carey et al. 2010).

V pokusoch na ryži bol identifikovaný transportér  $As^{III}$  OsABCC1, ktorý je zodpovedný za translokáciu  $As$  do nodov rastlín ryže kde prebieha jej sekvestrácia do vakuol. Pretože mutanty s knockoutovaným génom pre OsABCC1 mali vysoké koncentrácie  $As$  v zrnách a nízke v nodoch. Tieto výsledky naznačujú, že tento transportér, ktorý sa nachádza na tonoplaste nie je dôležitý len kvôli redukcii translokácie  $As$  do zrn cez sekvestráciu  $As$  do vakuol sprievodných buniek vo floéme, ale aj pre detoxikáciu  $As$  (viď nižšie) (Song et al. 2014). V ďalšom pokuse Deng et al. (2018), autori navrhli transgénne línie rastlín, ktoré mali znížiť koncentrácie  $As$  v ryžových zrnách, preto navrhli využiť transgénnu líniu s použitím nadmernej expresie OsABCC transportéru a druhú transgénnu líniu s nadmerne exprimovaným ScYCF1 (vakuolárny ABC transportér GSH, zvyšujúci odolnosť voči Cd zo *Saccharomyces cerevisiae*). Obidva tieto transportéry zvyšujú vakuolárnu sekvestráciu arzenu. Translokácia do zrn bola naozaj znížená, na druhej strane v iných nadzemných častiach rastlín dochádzalo k nadmernej akumulácii  $As$ , ktorá viedla k poškodeniu buniek a celých rastlín (Deng et al. 2018).

## 4. Detoxikácia $As$

Redukcia  $As^V$  na  $As^{III}$  je považovaná za prvý krok pri detoxikácii  $As$  v rastlinných pletivách. Táto redukcia prebieha enzymatickým spôsobom. Enzýmy, ktoré sa zúčastňujú tejto redukcie sa nazývajú arzenátoreduktázy (AR), ktoré využívajú na redukciu glutation (GSH). A gény, ktoré kódujú AR (AR gény) sa nachádzajú v celej rade rastlín, napr. *AtHAC1/ATQ1* (*Arabidopsis*), *OsHAC1; 1* a *OsHAC1; 2* (*Oryza*), *HlAsr* (*Holcus lanatus*) (zhrnuté v Souri et al. 2017). Redukcia  $As^V$  na  $As^{III}$  v hyperakumulátore *P. vittata* je taktiež sprostredkovaná pomocou AR a aktivita tohto enzýmu sa zvyšuje pri dlhšom vystavení a vyššej koncentrácii  $As^V$ . Aktivita AR *P. vittata* bola najmenej o 7-krát vyššia ako pri rastlinách, ktoré sú senzitivne na prítomnosť  $As$  (napr. *A. thaliana* a *O. sativa*) (Duan et al. 2005). AR v *P. vittata* vykazovala výhodné vlastnosti, pretože mala široké spektrum pH (oproti nehyperakumulujúcim rastlinám), pri ktorom bola

aktívna (5,5- 7,0; s optimom 6,5) a aj široké tepelné optimum (20-50 °C). Ďalej vykazovala vysokú špecifitu pre  $As^V$ , pretože ak v *médii* bolo  $As^V$  nahradené fosforečnanom sodným alebo dusičnanom sodným, tak AR nebola aktívna. Bola však kompetitívne inhibovaná fosfátom (podobné chemické vlastnosti) a nekompetitívne inhibovaná  $As^{III}$  (produkt redukcie  $As^V$ ) (Duan et al. 2005). Ďalším nástrojom pre detoxikáciu je glutation (GSH) a fytochelatíny (PC). Tieto zlúčeniny reagujú s  $As^{III}$  (preto je nutná redukcia  $As^V$  na  $As^{III}$ ), vytvárajú s ním komplexy a umožňujú jeho transport do vakuol v bunkách nadzemných častí rastlín aj koreňa (Zhao et al. 2009; Souri et al. 2017). PC nie sú priamo zodpovedné za detoxikáciu arzénu, avšak sú zodpovedné za vytvorenie komplexu s As a jeho transport do vakuoly. Preto bolo potrebné nájsť transportéry, ktoré sú schopné transportovať PC. V štúdiu od Song et al. (2010) boli objavené prvé rastlinné tonoplastové PC transportéry potrebné na zvyšovanie odolnosti voči arzénu v *A. thaliana*- AtABCC1 a AtABCC2. Syntéza AtABCC1 a AtABCC2 aj PC nie sú indukované prítomnosťou arzénu, v rastline sa syntetizujú aj pri normálnych (nestresových) podmienkach, preto aby rastliny rýchlo mohli reagovať na stres vyvolaný ťažkými kovmi obecné. Ďalej v tejto štúdiu autori ukázali možnú spoluprácu PC a AtABCC1 a AtABCC2 pri detoxikácii As. Ak sa zvýšila expresia len PCS (PC syntáza), mutantné rastliny nevykazovali vyššiu toleranciu k As oproti kontrolným rastlinám. Avšak ak sa okrem hladín PCS zvýšila syntéza AtABCC1, tolerancia k As sa zvýšila. Tieto výsledky ukazujú, že koexpresia PC transportéra typu ABC (ATP Binding Cassette) a PCS môže viesť k vytvoreniu rastlín so zvýšenou toleranciou voči arzénu. Podobný mechanizmus bol objavený v ryži, ABC transportér OsABCC1 je zodpovedný za transport  $As^{III}$ -PC komplexu do vakuoly (Song et al. 2014). Pomocou knockoutovania génu pre OsABCC1 sa preukázala možná úloha tohto transportéru pre toleranciu voči As, keďže rast nadzemných častí rastliny mutantných línií (bez funkčného OsABCC1) bol úplne inhibovaný pri ošetrovaní 50 $\mu$ M  $As^{III}$  a v *médii* bez As rástli rovnako ako kontrolné rastliny (Song et al. 2014). OsABCC1 sú lokalizované v tonoplaste buniek ryže. A ukázalo sa, že OsABCC1 je dôležitý pre prevenciu ukladania As do zrn ryže. Tým pádom by sa nadmerná expresia OsABCC1 mohla využívať ako stratégia na vyšľachtenie odrôd ryže, ktoré budú vysoko tolerantné k znečisteniu As, a najmä s nízkou koncentráciou As v zrnách ryže (Song et al. 2014). Medzi ďalšie spôsoby detoxikácie  $As^{III}$  patrí koreňový eflux, ktorý bol objavený vo veľkom počte rastlín. Eflux  $As^{III}$  sa deje cez transportéry kremíka (Zhao et al. 2009).



Obrázok 1: Prehľad prijmu, transportu, translokácie a detoxikácie As v rastline.  $As^V$  je pomocou fosfátových transportérov prijatý rastlinnými koreňmi. Kde je buď redukovaný na  $As^{III}$  pomocou AR (arsenátreduktázou), ktorá využíva glutation (GSH) ako reductant, alebo je translokovaný do xylému pomocou fosfátových transportérov.  $As^{III}$  je prijímaný pomocou aquaporínov nodulin 26-like intrinsic proteínov (NIP). Prijem metylovaných druhov arzénu (DMA/ MMA) sa uskutočňuje pomocou neznámych transportérov. Fytochelatíny (PC) a GSH koordinujú s  $As^{III}$  a vytvárajú rôzne komplexy, ktoré sú sekvastrované vo vakuolách, do ktorých sa transportujú pomocou transportérov typu ABC (Souri et al. 2017).

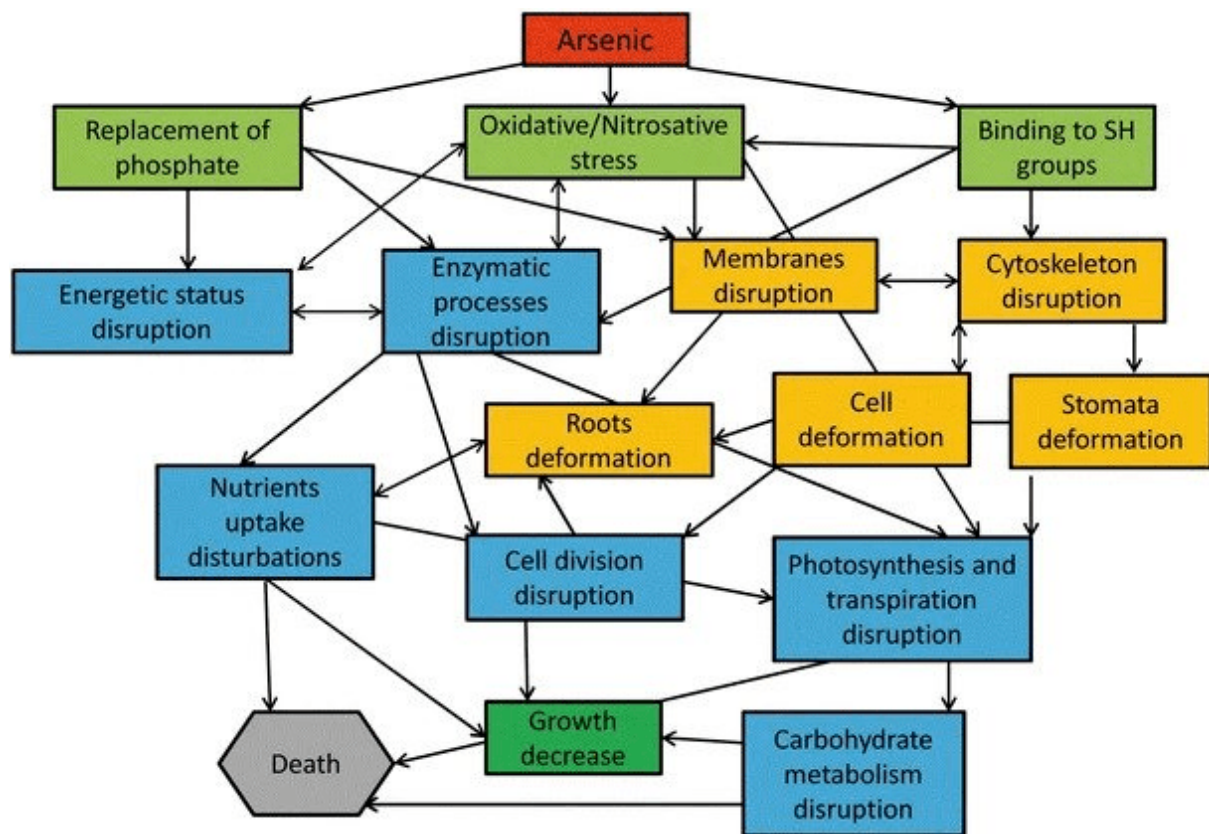
## 5. Fytotoxicita ťažkých kovov a As

Ťažké kovy sú pre rastliny dostupné až po tom, čo zmenia svoj oxidačný stav (napríklad vo forme solí). Toxicita pre rastliny je veľmi relatívna, závisí na koncentrácii prvku, ktorá je prístupná pre rastlinu. Na základe viacerých parametrov (počet listov, čerstvá hmotnosť, suchá hmotnosť, obsah chlorofylov a karotenoidov) na modelovej vodnej rastline *Lemna minor* bolo stanovené poradie prvkov podľa ich fytotoxicity:  $Ag^I > Cd^{II} > Hg^{II} > Tl^I > Cu^{II} > Ni^{II} > Zn^{II} > Co^{II} > Cr^{VI} > As^{III} > As^V >$  metylované formy As (Naumann et al. 2007).

Miera toxicity arzénu závisí na veľmi veľa faktoroch, napríklad na forme prijatého arzénu, jeho koncentrácii, dobe a spôsobe ošetrenia, druhu a veku rastliny. Anorganické formy, najmä arsenáty a arsenity, sú viac toxické ako organické arsenobetainy a arsenocholiny a metylované formy arzénu, ako sú MMA a DMA (Jedynak et al. 2010). Pri väčšine

rastlín platí, že v koreni je najväčšia akumulácia arzenu, a preto aj jeho toxicita je tu najvyššia. Toxicita arzenu je menšia v stonke a v listoch v tomto poradí (Siddiqui et al. 2013). Avšak fytotoxicita As závisí od rôznych rastlinných druhov (Finnegan and Chen 2012) a niekedy dokonca aj len od kultivarov (Abedin and Meharg 2002; Mahdieh et al. 2013).

Vo všeobecnosti má arzén fytotoxický účinok. V rastlinnom tele má As negatívny vplyv na rast, morfológické, fyziologické a biochemické deje (Abbas et al. 2018; Kofroňová et al. 2018). Mimo iné je zodpovedný za nadmernú produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), a teda je zodpovedný za oxidačný stres (napr. Leterrier et al. 2012; Ghosh et al. 2016), ktorý môže zapríčiniť poškodenie bunky alebo dokonca aj bunkovú smrť (Sharma et al. 2012). Ďalej je zodpovedný za poruchy pri metabolizme lipidov, proteínov a iných esenciálnych zlúčenín (zhrnuté napr. v Abbas et al. 2018). Medzi najviac negatívne zasiahnuté fyziologické deje patrí fotosyntéza. Negatívne ju ovplyvňuje na rôznych úrovniach (Kofroňová et al. 2020). As má tiež negatívny vplyv na rast koreňov, nadzemných častí rastlín a výnos rastlín (napr. u ryže (Azizur Rahman et al. 2007)).



Obrázok 2: Negatívny vplyv As na rôzne biochemické a fyziologické deje, ktoré negatívne ovplyvňujú morfológiu a rast rastlín alebo môžu dokonca viesť k smrti rastliny (prevzaté z Kofroňová et al. 2018)

## 5.1 Efekt As na fotosyntézu

Arzén má vo všeobecnosti negatívny efekt na fotosyntézu. Tento efekt ťažkých kovov, vrátane arzenu, je považovaný za najčastejší účinok na rastliny. Miera redukcie fotosyntézy závisí na forme prijatého arzenu a na jeho koncentrácii. Súhrne nám štúdie ukazujú, že arzén negatívne ovplyvňuje fotosyntézu tým, že poškodzuje fotosystémy, syntézu ATP a NADPH, fotosyntetické pigментy, translokáciu dôležitých prvkov pre fotosyntézu

a membrány tylakoidov. Týmto významne ovplyvňuje aj fixáciu CO<sub>2</sub> a tvorbu cukrov ako koncových produktov fotosyntézy (zhrnuté napr. v Kofroňová et al. 2018).

#### 5.2.1 Vplyv As na fotosystémy

Arzén spôsobuje dysfunkciu fotosystému II (PSII), čím sa znižuje efektivita fotosyntézy (napr. Austruy et al. 2013). U rastlín *A. thaliana*, ktoré boli ošetrované rôznymi koncentraciami Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> počas piatich dní, vykazovali poškodenie fotosystémov II (PSII), čo viedlo k zníženiu čistej fotosyntézy oproti kontrole.

Štúdia Austruy et al. (2013) odhalila, že rastliny *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum* a *V. faba*, ktoré rástli v pôdach a boli znečistené ťažkými kovmi (aj As), mali taktiež poškodený fotosystém II (PSII). Poškodené boli hlavne antény PSII čím sa zmenšila schopnosť tohto systému premieňať svetelnú energiu na chemickú.

Meranie fluorescencie chlorofylu a nám hovorí o vitalite PSII a tento parameter je často negatívne ovplyvnený pôsobením arzénu. Napr. v práci Kofroňová et al. (2020) pri senzitivnom kultivare tabaku *Nicotiana sylvestris* dochádzalo k výraznému zníženiu fluorescencie chlorofylu pri 30 µg.l<sup>-1</sup> As<sup>V</sup>. Pomer Fv/Fm (meranie fluorescencie chlorofylu) bolo výrazne znížené pri 216 µM As<sup>V</sup>, čo nám poukazuje na negatívny účinok As na fotosystém II (Pita-Barbosa et al. 2019).

#### 5.2.2 Vplyv As na fotosyntetické pigmenty

Hlavný toxický účinok ťažkých kovov (vo všeobecnosti) na fotosyntézu spočíva v inhibícii syntézy a stability chlorofylu. Odozvy na prítomnosť znečistenia sú veľmi variabilné u rôznych druhov a v rôznych mierach znečistenia pôdy. Pri rastlinách ryže (*Oryza sativa*) sa významne znižovala koncentrácia chlorofylu a aj b až pri vyšších koncentraciách arzénu v médiu (>10 mg.kg<sup>-1</sup>). Zníženie obsahu chlorofylu v listoch ryže viedlo okrem zníženiu fotosyntézy aj k zníženiu biomasy rastlín. Aj keď množstvo chlorofylu neovplyvňuje priamo biomasu rastliny, tento pokus ukazuje koreláciu medzi týmito parametrami (Azizur Rahman et al. 2007).

V štúdií Austruy et al. (2013) zistili, že *S. nigrum* nevykazoval veľké zmeny v koncentraciách chlorofylu a (Chl a), ale pri druhu *A. capillaris* sa významne znížila koncentrácia chlorofylu b (Chl b) v najviac znečistenej pôde. Pri oboch druhoch koncentrácia Chl b značne poklesla. V rastline *V. faba* stačila mierne znečistená pôda so stopovými množstvami As, aby sa významne znížila koncentrácia chlorofylu a aj b v listoch. Tieto výsledky ukazujú veľkú citlivosť tejto rastliny na znečistenie. Ďalšie štúdie potvrdzujú negatívny vplyv arzénu na syntézu chlorofylov v listoch. Podľa Stoeva et al. (2005) v rastlinách fazule došlo taktiež k inhibícii syntézy chlorofylu v dôsledku vystavenia rastlín arzénu, čo viedlo k zníženiu obsahu chlorofylu v listoch.

#### 5.2.3 Vplyv As na syntézu ATP a NADPH a zníženie fixácie CO<sub>2</sub>

Ak rastlina prijíma arzenát, tak sa počas fotochemickej fázy fotosyntézy môžu ióny As<sup>V</sup> infiltrovať do ETR (elektrotransportného reťazca) miesto fosfátov (Gusman et al. 2013). As<sup>V</sup> prechádza cez bunkové membrány pomocou fosfátových transportérov, čo vedie k narušeniu rovnováhy zásobovania bunky fosfátmi. As<sup>V</sup> súťaží s fosfátmi v fosforylačných reakciách, za vzniku nestabilných As<sup>V</sup> zlúčenín. Napríklad As<sup>V</sup>-ADP komplex, ktorého autohydrolýza spúšťa cyklus, ktorý vedie k zníženiu tvorby ATP (Finnegan and Chen 2012). Taktiež je zvýšená fluorescencia a energia sa vo vyššej miere uvoľňuje vo forme tepla (Gusman et al. 2013).

As tiež negatívne ovplyvňuje stomatálnu vodivosť (pri  $As^V$  znížená o 61%, pri  $As^{III}$  znížená o 78%), čím sa znižuje koncentráciu  $CO_2$  v rastline. Nízka koncentrácia  $CO_2$  v rastline spôsobuje narušenie funkcie  $CO_2$  fixácie enzýmu RUBISCO (Ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza), čo vedie k zvyšovaniu koncentrácie neviazaného  $CO_2$ , čo naznačuje priame poškodenie procesu fixácie  $CO_2$ . Pravdepodobne k tomu dochádza vplyvom zníženia aktivity a/alebo množstva RUBISCO v Calvinovom cykle (Gusman et al. 2013). Iniciačná fluorescencia v *A. thaliana* bola zvýšená o 50% pri ošetrovaní 216  $\mu M$   $As^V$ , čo poukazuje na poškodenie biochemických procesov spojených s asimiláciou  $CO_2$  (ktorá bola blízko nule) (Pita-Barbosa et al. 2019).

#### 5.2.4 Vplyv As na translokáciu prvkov dôležitých pre fotosyntézu

Dusík je dôležitou súčasťou RUBISCO, ktoré tvorí zásadnú N v rastline a ekosystéme obecné a jeho nedostatok sa prejaví aj v jeho funkcii. Dusík tvorí jadro v molekule chlorofylu, tým pádom jeho koncentrácia koreluje s koncentráciou chlorofylu v listoch. Vyššie koncentrácie arzénu v médiu negatívne ovplyvňujú príjem dusíka v rastlinách hrachu (*Pisum sativum*) (Paivoke 1983). Výskum Azizur Rahman et al. (2007) ukázal, že vyššie koncentrácie arzénu v pôde negatívne ovplyvňujú koncentráciu dusíka v rastlinách ryže, tým sa zmenší čistá fotosyntéza v dôsledku zníženia obsahu chlorofylu.

#### 5.3 Efekt As na klíčivosť semien rastlín

Vplyv arzénu na klíčivosť rastlín je väčšinou negatívny. Na 8 odrodách ryže bol zistený negatívny efekt arzénu na klíčenie. Avšak záleží na odrode a pôsobení arzenitu alebo arzenátu. Pričom arzenit mal silnejší negatívny vplyv ako arzenát (Abedin and Meharg 2002). Mahdieh et al. (2013) preukázali efekt As na klíčenie pšenice, skúmali dve odrody pšenice „Zarin“ a „Sardari“, ktoré vykazovali značné zníženie klíčivosti pri koncentrácii  $As^V$  15  $mg.l^{-1}$ . Pokles klíčivosti bola pre túto koncentráciu 19,5% („Zarin“) a 26,01% („Sardari“). Taktiež pri najvyššej koncentrácii As (30  $mg.l^{-1}$ ) vykazovala odroda „Zarin“ vyššiu klíčivosť ako druhá odroda „Sardari“, čo autori vysvetľujú ako prirodzenú vlastnosť týchto odrôd, ktoré sú rôzne odolné. So zvyšujúcou sa koncentráciou oboch anorganických foriem arzénu ( $As^{III}$ ,  $As^V$ ) klíčenie semien slnečnice (*Helianthus annuus*) klesalo (Muhammad et al. 2013). Ako pri predchádzajúcich štúdiách aj táto štúdia potvrdila, že  $As^{III}$  je toxickjší pre rastliny ako  $As^V$ . Obidve formy anorganického arzénu mali vplyv aj na čas klíčenia. Slnečnicové semená klíčili pri nízkych koncentráciách arzenátov aj arzenitov skôr ako kontrola, ktorá nebola vystavená obom soliam arzénu, ale naopak pri vyšších koncentráciách  $As^{III}$  a  $As^V$  klíčenie semien bolo mierne oneskorené. Tieto výsledky ukazujú možný pozitívny vplyv nízkych koncentrácií As na klíčenie, ale na druhej strane negatívny vplyv vyšších koncentrácií As na klíčenie semien slnečnic (Muhammad et al. 2013).

#### 5.4. Efekt As na rast biomasy

Existuje veľa štúdií, ktoré sa zaoberajú vplyvom arzénu na rast rastlín. V štúdiu Abedin and Meharg (2002), ktorá porovnávala vplyv  $As^{III}$  a  $As^V$  na rast biomasy (korene a nadzemnú časť rastlín) rôznych varietou ryže. Zaujímavé je že, korene, ktoré boli ošetrované arzenitom boli ovplyvnené menej ako rastliny, ktoré boli ošetrované arzenátom. To naznačuje, že arzenát má negatívnejší vplyv (korene boli kratšie) na rast koreňov ako arzenit a to najmä v stredných koncentráciách (2 a 4  $mg.l^{-1}$   $As^V$ ). Pri najvyššej koncentrácii (8  $mg.l^{-1}$   $As^{III}$ ) bola situácia opačná. Pravdepodobne sa až pri tejto koncentrácii prejavila vyššia toxicita arzenitu, pretože dovtedy fungovali detoxikačné mechanizmy ryže. Ani jedna z variet nevykazovala zvýšenú odolnosť voči arzénu na rast koreňov. Zníženie relatívnej výšky nadzemnej časti rastliny bolo



zrejme pri oboch formách arzenu ( $As^{III}$  a  $As^V$ ). Rastliny, ktoré boli ošetrované arzenitom boli o niečo nižšie ako rastliny, ktoré boli ošetrované arzenátom. Rozdiely boli však medzi rôznymi varietami ryže, čo autori vysvetľujú ako rozdiel, ktorý je zabezpečený sezónnosťou jednotlivých variet. Variety, ktoré rastú v období sucha sú odolnejšie ako tie, ktoré rastú v období dažďov, čo môže znamenať, že variety, ktoré rastú v období sucha sú lepšie prispôsobené na stres vyvolaný arzénom ako tie čo rastú v období dažďov. Vyššia tolerancia voči arzénom môže byť spojená lepším prispôbením odrôd rastúcich v období sucha k oxidatívnym stresom, ktoré sú spôsobované suchom aj arzénom. Rast paradajok (*Lycopersicon esculentum*) a fazule (*Phaseolus vulgaris*) bol taktiež ovplyvnený arzénom ( $As^{III}$ ). Zvyšovaním koncentrácie  $As^{III}$  (2, 5, 10  $mg.l^{-1}$ ) sa dramaticky znižovala biomasa koreňov, stoniek a listov oproti kontrole. Rastliny fazúl vykazovali väčšiu citlivosť na  $As^{III}$  pri všetkých skúmaných koncentráciách, a teda aj efekt na biomasu (zmenšovanie biomasy) bol vyšší na fazuliach. Taktiež plody paradajok a fazúl vykazovali zmenšenie. A tak ako pri biomase rastlín aj plody fazúl boli negatívnejšie ovplyvnené. Toto je pravdepodobne zapríčinené, tým že rajčiny majú zmenšenú translokáciu As z koreňa do nadzemných častí rastlín a efektívnejší mechanizmus sekvestrácie do bunkových kompartmentov (Carbonell-Barrachina et al. 1997).

Rastliny *Armoracia rusticana*, ktoré boli vystavené  $As^V$  po 7 dní mali znížený rast biomasy koreňov len pri vyšších koncentráciách (60  $\mu g.l^{-1}$ ). Ako ďalšie bola ovplyvnená štruktúra koreňa, aj keď nedochádzalo k týmto zmenám pri 7 dňovom vystavení, pri 14 dňovom vystavení  $As^V$  došlo k negatívnemu vplyvu na morfológiu koreňa. Avšak zaujímavé bolo, že tieto zmeny v morfológii a v znížení biomasy koreňa neboli také vážne, ako sa očakávalo. To naznačuje, že chren sa dokáže celkom dobre vysporiadať aj s vyššími hladinami As (Kofroňová et al. 2019). V štúdií Siddiqui et al. (2013) preukázali rôzny vplyv príjmu arzenu na bazalku (*Ocimum spp.*). V závislosti na koncentrácii a dĺžke vystavenia účinku As došlo ku zníženiu výšky rastliny a zníženie biomasy. Avšak pri nízkej koncentrácii (10  $\mu M$   $As^{III}$ ) a 5 dňovému vystaveniu účinku As došlo k miernemu zvýšeniu biomasy a výšky rastliny.

## 6. Hyperakumulátory

Pod pojmom hyperakumulátory sú združené rastliny, ktoré akumulujú ťažké kovy a polokovy v rádovo vyšších koncentráciách ako iné rastliny, bez toho aby vykazovali fyto toxické účinky prvkov. Na definovanie rastlinných hyperakumulátorov bola definovaná referenčná štandardná rastlina, ktorá je definovaná podľa typických koncentrácií kovov a polokovov v rastlinnom tele. Koncentrácie jednotlivých kovov/ polokovov sú nasledovné: ( $\mu g / g$ ) Ni (1,5), Zn (50), Cd (0,05), Pb (1), Cu (10), Co (0,2), Cr (1,5), Mn (200), Tl (0,02), As (0,1) a Se (0,02). Pre praktické potreby sú definované hyperakumulátory ako rastliny, ktoré akumulujú v normálnych pôdach o 2-3 rády vyššie koncentrácie kovov/ polokovov alebo v pôdach bohatých na kovy o 1 rád vyššie koncentrácie jednotlivých kovov/ polokovov v listoch (van der Ent et al. 2013). Koncentrácie týchto potencióálne toxických prvkov môžu byť vyššie ako koncentrácie makronutrientov (katióny K, Ca). Táto schopnosť akumulovať potencióálne toxické prvky v takto veľkých koncentráciách je nevyhnutne spojená so schopnosťou detoxikovať tieto nahromadené kovy v nadzemných častiach rastlinného tela, a teda s hypertoleranciou. Schopnosť hyperakumulovať kovy má asi 500 rastlinných taxónov (cca 0,2% krytosemenných rastlín). Schopnosť hyperakumulácie u rastlín sú extrémne, komplexné fyziologické vlastnosti selektované prírodným výberom. S najväčšou

pravdepodobnosťou je táto vlastnosť spojená s obranou proti stresom: obrana proti herbivorom a/ alebo patogénom (Krämer 2010).

Hyperakumulátory môžeme rozdeliť na obligátne a fakultatívne. Obligátne sú endemické, a tým pádom sa vyskytujú len na pôdach s vyššími koncentráciami určitého kovu. Na druhej strane máme fakultatívne hyperakumulátory, ktoré sa môžu, ale nemusia správať ako hyperakumulátory. Fakultatívne hyperakumulátory a ich schopnosť hyperakumulovať ťažké kovy môže byť ovplyvnená genetickými odlišnosťami medzi rôznymi (oddelenými) populáciami toho istého druhu alebo rozdielmi vo vlastnostiach pôdy (dostupnosť a absorpcia kovových iónov). Rozdiely v pôdach sú výsledkom rôznych premenných napr. celková koncentrácia prvku v pôde; prítomnosť kovu v rôznych fázach alebo chemických formách; rozdiely v pH pôdy; koncentrácie hlavných prvkov v pôde; fyzikálne faktory, ako sú miestne zrážky, pórovitosť pôdy a charakteristiky odparovania. Fakultatívne hyperakumulátory sa nachádzajú na normálnych pôdach alebo na pôdach bohatých na kovy. Tým pádom rastliny sú fakultatívne hyperakumulátory, keď druh alebo miestna populácia má tendenciu v nadmernom množstve akumulovať kovy a pôdne podmienky zabezpečujú dostatočnú dostupnosť kovu (van der Ent et al. 2013).

### 6.1 Zmeny vo fyziologických vlastnostiach hyperakumulátorov

Krämer (2010) vo svojom review zhrnul jednotlivé fyziologické zmeny, ktoré sú spojené s hyperakumuláciou. Vo väčšine rastlín sa hromadia kovy v koreňoch, preto v koreňoch je omnoho vyššia koncentrácia kovových prvkov ako v nadzemných častiach rastliny. Na druhej strane v hyperakumulátoroch je to naopak, vyššie koncentrácie kovov sú v listoch ako v koreňoch. Tento jav je spojený so zmenou fyziologických vlastností hyperakumulátorov, ktoré sú nasledovné:

- Transport hyperakumulovaného kovu (kovov) zo symplastu koreňa do apoplasmatického xylému je veľmi zvýšený, teda zvýšená je translokácia z koreňa do nadzemných častí rastliny. Tento transport je taktiež zapríčinený vysokou kapacitou pre ukladanie akumulovaných kovov v nadzemných častiach rastlinného tela.
- Detoxikácia a sekvestrácia ťažkých kovov prebieha v listoch, najmä vo vakuolách buniek listového mezofylu
- Mobilita kovov symplastom koreňa cez cievné zväzky z koreňa je veľmi zvýšená, je to spôsobené napríklad tým, že sekvestrácia kovov vo vakuolách koreňových buniek je veľmi redukovaná.
- Absorpcia kovov koreňom je zvýšená so zvyšujúcim sa  $V_{MAX}$  (maximálna rýchlosť) a bez veľkých zmien v  $K_M$  (Michaelisova konštanta), čo je zapríčinené zvýšenou expresiou transportérov pre jednotlivé kovy (Lombi et al. 2002)
- V bunkách nadzemných častí rastlín je zvýšená miera vykladania As z xylému a k tomu medzi bunkami je veľmi efektívna distribúcia kovov, čo má za výsledok, že miesta pre ukladanie kovov sú prístupné a zároveň nedochádza k nadmernej akumulácii kovov v bunkách pozdĺž dráhy transportu k úložným miestam.
- Je zvýšená ochrana koreňových buniek pred toxicitou kovov, a to rýchlym transportom kovov do nadzemných častí rastliny a ďalšími mechanizmami (Krämer 2010).

## 6.2 Hyperakumulátory As

Sú rastliny, ktoré akumulujú arzén vo vyšších koncentráciách ako iné, tým pádom o nich hovoríme ako o hyperakumulátoroch arzénu. Hlavne druhy papradín z čeľade *Pteridaceae* vykazujú túto schopnosť akumulovať arzén vo vysokých koncentráciách (Reeves et al. 2018).

Prvá známa rastlina, ktorá je považovaná za hyperakumulátora arzénu je *Pteris vittata*. Táto papraď efektívne extrahovala z pôdy arzén v znečistených pôdach 1442–7526 mg.kg<sup>-1</sup> a v normálnych (neznečistených) pôdach extrahovala 11,8 - 64,0 mg.kg<sup>-1</sup>. Tieto hodnoty vysoko prekračujú hodnoty, ktoré sú bežné pre rastliny, ktoré rastú v neznečistených pôdach a extrahujú menej ako 3,6 mg.kg<sup>-1</sup> As<sup>III</sup>. *P. vittata* tolerovala aj pôdy, ktoré obsahovali 1500 mg.kg<sup>-1</sup> arzénu. V takýchto pôdach sa zvýšila koncentrácia v listoch z 29,4 na 15 861 mg.kg<sup>-1</sup> za dva týždne. V pôde, ktorá obsahovala len 6 mg.kg<sup>-1</sup> arzénu, akumulovala 755 mg.kg<sup>-1</sup> v listoch taktiež za 2 týždne. Koncentrácia arzénu v koreňoch obsahovala menej ako 303 mg.kg<sup>-1</sup>, kdežto v listoch dosahovala 7234 mg.kg<sup>-1</sup>. Dokonca pridanie 100 mg.kg<sup>-1</sup> arzénu viedlo k významnej stimulácii rastu (zvýšenie biomasy o 40% oproti kontrole) (Ma et al. 2001). Tieto výsledky nám ukazujú, že táto papraď spĺňa všetky požiadavky hyperakumulátora As.

Od objavenia prvého známeho hyperakumulátora As, *P. vittata*, sa doteraz objavili ďalšie a celkovo ich je 5, a všetky prirodzene sa vyskytujú v Ázii (Reeves et al. 2018). Všetky patria do čeľade *Pteridaceae* najmä z rodu *Pteris*. Je veľmi pravdepodobné, že ich bude identifikovaných viac, pretože len malá časť z cca 400 druhov, z čeľade *Pteridaceae*, bolo skúmaných na akumuláciu As (Zhao et al. 2009). Medzi identifikované hyperakumulátory patria napríklad *P. cretica*, *P. longifolia* a *P. umbrosa*, ktoré podobne ako *P. vittata* akumulovali As prednostne do listov. Koncentrácia As v listoch bola v priemere 6,8 krát vyššia ako v koreňoch a rástla lineárne s koncentráciou As v pôde. Pri koncentrácii 500 mg.kg<sup>-1</sup> As v pôde dosahovala koncentrácia 6200–7600 mg.kg<sup>-1</sup> (Zhao et al. 2002).

Prvý druh identifikovaný ako hyperakumulátor As z papradí, ktorý nepatrí do rodu *Pteris* je *Pityrogramma calomelanos*. Rastliny rástli v pôdach, ktoré obsahovali 135– 510 mg.kg<sup>-1</sup> As. Taktiež najviac As akumulovali v listoch, ktoré obsahovali 2760– 8350 mg.kg<sup>-1</sup>. Zaujímavé však bolo, že najvyššie koncentrácie As v listoch boli pri rastlinách, ktoré rástli v najmenej znečistených pôdach (135 mg.kg<sup>-1</sup>). To naznačuje, že *Pityrogramma calomelanos* ľahko absorbuje arzén z menej znečistených pôd, a tým pádom by mohol efektívne znižovať obsah arzénu v pôde (Francesconi et al. 2002). Tak isto ako druhy z rodu *Pteris* je celosvetové využitie *Pityrogramma calomelanos* problematické, pretože sa prirodzene vyskytuje v Ázii.

Strom *Pseudotsuga menziensie*, ktorý rástol v okolí zlatých baní, ktoré má pôdy bohaté na rôzne formy arzénu, taktiež vykazoval hyperakumuláciu As. Ihlice týchto stromov obsahovali 257 ± 11 mg.kg<sup>-1</sup> As, čo sú cca 500 krát vyššie hodnoty ako mali smrek, ktoré rástli na tom istom území (0,4 ± 0,01 mg.kg<sup>-1</sup> As). V ihličí sa nachádzali vyššie koncentrácie As<sup>III</sup>, kdežto As<sup>V</sup> bol viac dominantný v kmeňoch stromov. Metylované formy arzénu (MMA a DMA) boli v rastlinách detegované len v stopových koncentráciách (Haug et al. 2004). Avšak *P. menziensie* je nevhodný kandidát na použitie v praxi, pretože rastie veľmi pomaly, čo je nevýhodná vlastnosť pre rastliny, ktoré by potencionálne mohli byť využívané pri fytoremediácii.

Taktiež druhy rodu *Ocimum* (*O. tenuiflorum*, *O. basilicum* a *O. gratissimum*) boli skúmané ako potencionálne hyperakumulátory As. Maximálna akumulácia pri všetkých troch druhoch bola pri koncentrácii 100 µM As<sup>III</sup> pri 10 dňovom ošetrovaní. Najviac As bolo akumulované v *O.*

*gratissimum* (831 mg.kg<sup>-1</sup>) nasledovaným *O. basilicum* (764 mg.kg<sup>-1</sup>) a *O. tenuiflorum* (662 mg.kg<sup>-1</sup>). *O. gratissimum* vykazovalo najvyššie koncentrácie As v nadzemných častiach rastliny, preto je najlepším kandidátom stať sa fyto mediátorom z rodu *Ocimum*. Ďalšou výhodou je, že As sa nenachádzal vo vysokých koncentráciách v esenciálnych olejoch, ktoré sú hojne využívané ako konečný komerčný produkt. Dôležitým pozitívom je, že ide o rastliny, ktoré sa ľahko odstraňujú jednoduchým vykorenením. Využitie rodu *Ocimum* má veľký potenciál na fyto mediáciu, pretože by teda prinieslo dvojité výhody. Okrem potenciálu pri čistení kontaminovaného miesta sú tu hospodárske výhody, ako je výťažok esenciálnych olejov. Avšak tieto oleje sa používajú v medicíne a schopnosť akumulovať As je pre lekárske potreby nevýhodná. Preto by fyto mediácia pomocou rodu *Ocimum* mala byť prísne regulovaná (Siddiqui et al. 2013). Nevýhoda je aj malá biomasa, ktorú tvoria a potencionálne riziko využívania listov ako koreniny, kde sa As akumuluje vo vyšších koncentráciách.

## 7. Fyto mediácia

Pod pojmom fyto mediácia sú zahrnuté metódy, ktoré využívajú rastliny na odstránenie, redukciu, degradáciu alebo imobilizáciu nebezpečných kontaminantov zo substrátu, ktoré ohrozujú životné prostredie. K fyto mediálnym technikám sa využívajú prirodzené vlastnosti rastlín alebo geneticky upravené rastliny (napr. Rai et al. 2020). Preukázali sa aj pozitívne výsledky pri pokusoch o vyčistenie substrátu od organických zlúčenín, ale najväčší záujem aj úspechy sa preukázali pri remediáciách pôd, ktoré sú znečistené kovmi a polokovmi. Fyto mediálne techniky využívajú hyperakumulátory, ktoré dokážu tolerovať a akumulovať vyššie koncentrácie kontaminantov ako iné nehyperakumulujúce rastliny. Napriek tomu, že hyperakumulátory vedia tolerovať zvýšenú koncentráciu kontaminantov, nedokážu dlhodobo prežiť v extrémnych podmienkach (veľmi vysoké koncentrácie kontaminantu), preto sú fyto mediálne techniky vhodné len do nízko a stredne kontaminovaných oblastí. Fyto mediálne technológie sú vhodné na vyčistenie veľkých plôch. Jedno z hlavných obmedzení fyto mediácie spočíva v tom, že hĺbka čistenia pôd je obmedzená hĺbkou koreňového systému jednotlivých rastlín, ktoré sú použité. Podľa rastlín, ktoré sú použité sa vyčistenie substrátu môže dosahovať niekoľko centimetrov až niekoľko metrov (Vara Prasad and de Oliveira Freitas 2003).

Efektívnosť fyto mediálnych techník závisí na veľkosti vytvorenej biomasy (čím menšie rastliny, tým je menšia akumulácia As v rastlinnom tele) a na schopnosti transportovať kontaminanty do nadzemných častí rastliny, aby sa efektívnejšie mohol kontaminant odstraňovať zberom. Preto dôležitým faktorom rastliny, ktorá sa využíva na fyto mediáciu je efektívny transport kontaminantu z koreňov do nadzemných častí rastliny, a teda koncentrácia kontaminantu by mala byť vyššia v nadzemných častiach rastliny. The bioconcentration factor (BF) je definovaný ako pomer koncentrácie kontaminantu v pôde ku koncentrácii v rastlinnom tele. Tieto hodnoty BF lepšie charakterizujú hyperakumuláciu ako samotná koncentrácia kontaminantu v rastlinných pletivách (Fayiga and Saha 2016).

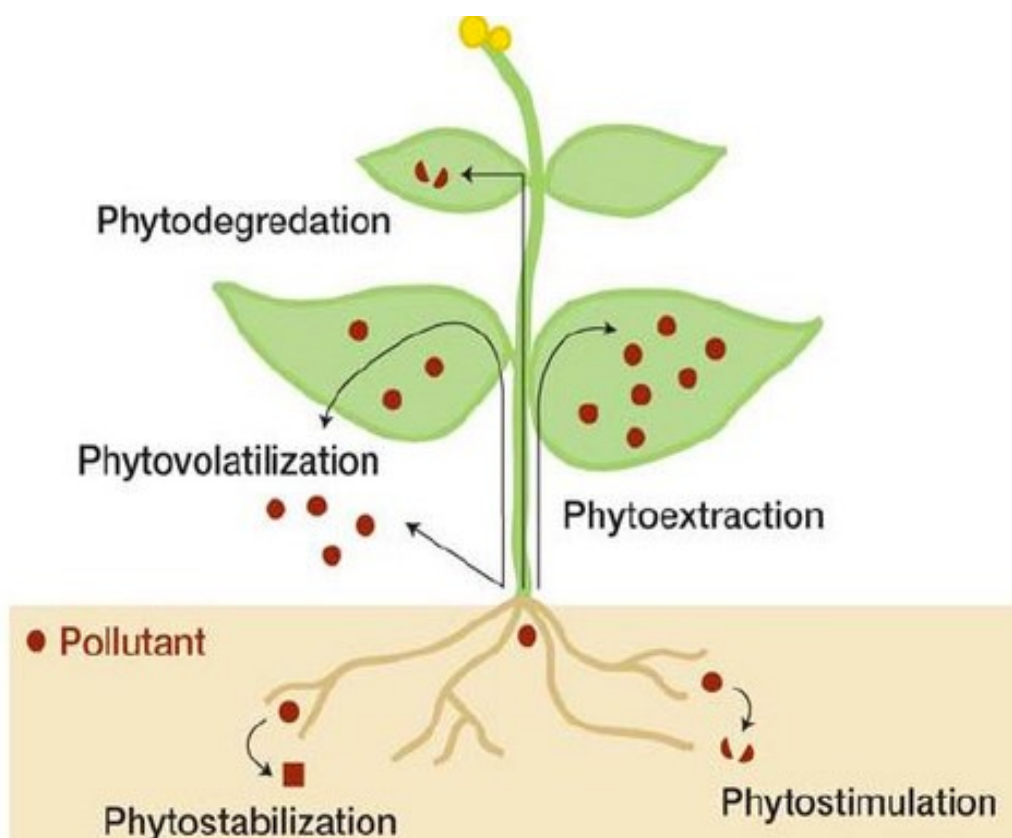
Fyto mediácia pozostáva zo štyroch rôznych rastlinných technológií, z ktorých každá má odlišný mechanizmus účinku na sanáciu pôdy, sedimentu alebo vody znečistenej kovmi (napr. Vara Prasad and de Oliveira Freitas 2003). Patria sem:

- fyto stabilizácia, kde na rozdiel od iných fyto mediálnych techník nie je cieľom odstránenie kovových kontaminantov z lokality, ale ich stabilizácia a zníženie rizika pre ľudské zdravie a životné prostredie. Rastliny, ktoré sa využívajú na fyto stabilizáciu

by nemali dobre translokovať škodlivé kontaminanty do nadzemných častí, pretože tak by ich mohli ľudia alebo zvieratá konzumovať a tým by sa dostali do potravinového reťazca. Je to výhodná technika na zníženie rizika kontaminácie na miestach, kde podmienky nedovoľujú okamžité využitie iných fyto-remediačných techník alebo tieto znečistené oblasti nie sú prioritou. Fytostabilizácia sa komerčne používa na pôdy, ktoré sú znečistené Pb, Zn a Cu.

- fytovolatilizácia, ktorá zahŕňa použitie rastlín na extrakciu určitých kovov z pôdy a ich následným prchavým uvoľňovaním do atmosféry. Takýmto spôsobom sa môžu odstraňovať kovy, ktoré môžu byť aj v plynnej fáze, teda As, Hg a Se. Ide o najkontroverznejšiu fyto-remediačnú metódu, pretože Hg a Se sú vysoko toxické a ich vypúšťanie do atmosféry nie je bezpečné. Na rozdiel od rastlín, ktoré sa používajú na fytovolatilizáciu Se, sú rastliny, ktoré sa používajú na prchanie Hg, geneticky modifikované organizmy. Avšak táto metóda by sa nemala používať v blízkosti ľudských miest, pretože sa kontaminanty dostávajú do ovzdušia a tak by mohli mať negatívny vplyv na zdravie obyvateľstva.
- rhizofilizácia, ktorá zahŕňa použitie rastlín na čistenie rôznych vodných prostredí. Rhizofiltrácia je sľubnou alternatívou ku konvenčným odstraňovaniam kovov vo vodnom prostredí. Princíp rhizofiltrácie je hydroponické pestovanie rastlín. Tie sa presádzajú do znečistených vôd, kde akumulujú kovy do svojich koreňov a nadzemných častí. Na úspešné vyčistenie vôd rhizofiltráciou je dôležitý je výber rastliny podľa vhodných vlastností ako sú: vysoká tolerancia a akumulácia kontaminantu/ov, ľahká manipulácia, nízke náklady na údržbu a minimálne množstvom sekundárneho odpadu, ktorý si vyžaduje likvidáciu, vysoká tvorba koreňovej biomasy. Kvôli tvorbe dostatočnej koreňovej biomasy sú na rhizofiltráciu vhodnejšie terestrické rastliny, ktoré tvoria dlhé vláknité koreňové systémy s dostatočnou plochou na absorpciu kontaminantov. Využívanie tejto remediačnej techniky podporujú jej výhody. Je to lacná, efektívna metóda, ktorá sa dá použiť na širšie spektrum kontaminantov. Medzi ďalšie výhody patrí ekologickosť, pretože sa nemusia využívať chemikálie, ktoré sa používajú pri konvenčných remediačných metódach a v neposlednom rade je to estetická stránka, keď sa na znečistených miestach vysadia rastliny toto miesto je vnímané verejnosťou ako čisté a zdravé. Využíva sa na fyto-remediáciu Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn a As a taktiež aj na sanáciu rádioaktívnych prvkov ako napr. U.
- fytoextrakcia, kde rastliny absorbujú kovy z pôdy a premiestňujú ich do zberateľných častí rastlín (nadzemné časti), kde sa akumulujú. Termíny fytoextrakcia a fyto-remediácia sú často, a nesprávne označované ako synonymá. Fytoextrakcia využíva hyperakumulátory na čistenie pôdnych substrátov. Nadzemné časti rastlín (alebo celé rastliny aj s koreňmi) sa zbierajú, a tak sa kontaminanty natrvalo odstránia z pôdy. Nevýhodou fytoextrakcie je, že to je dlhodobý proces, ktorý musí byť sprevádzaný viacerými cyklami zberu nadzemných častí, aby sme dostali požadovaný výsledok-. Výber lokality má prvoradý význam. Fytoextrakcia je použiteľná iba na miestach, ktoré obsahujú nízke až stredné úrovne znečistenia kovmi, pretože pestovanie rastlín na silne znečistených pôdach nie je možný v dlhodobom horizonte. Fytoextrakcia je vhodná na sanáciu veľkých plôch pôdy, ktoré sú kontaminované v plytkých hĺbkach. Kovy v pôde musia byť biologicky dostupné. Dôležité sú taktiež vlastnosti rastlín. Pre najvyšší účinok musíme mať rastlinu, ktorá má vysokú tvorbu

biomasy a schopnosť vysokej akumulácie daného kovu, ktorý musia tolerovať. Medzi ďalšie vhodné vlastnosti rastlín patrí schopnosť tolerovať ťažké pôdne podmienky (t.j. pH pôdy, slanosť, štruktúra pôdy, obsah vody), produkcia hustého koreňového systému, ľahká starostlivosť a výsadba a málo problémov s patogénmi a herbivormi. Používa sa na fytoremediáciu Zn a najmä As. Fytoextrakciou môžeme z pôdy získať aj vzácne kovy, ktoré sú vyextrahované z popola a slúžia ako zdroje príjmov. Túto techniku nazývame fyto-mining.



Obrázok 3: Osud kontaminantu pri najpoužívanejších fytoremediálnych technikách pôdy (Pilon-Smits 2005): môže byť v rhizosfére stabilizovaný alebo degradovaný. V nadzemných častiach môže byť uložený do rastlinných pletív, degradovaný alebo premenený na prchavú formu a vpustený do atmosféry

## 7.1. Využitie hyperakumulátorov As pri fytoremediácii znečistených pôd

### 7.1.1 Fytoextrakcia As

Fytoextrakcia As bola najviac preskúmaná na prvom známom hyperakumulátore As, teda *P. vittata*. Vo všetkých pokusoch, ktoré skúmali účinnosť fytoextrakcie pomocou *P.vittata* sa finálna koncentrácia As v pôde výrazne znížila. Tieto výsledky nám naznačujú, že *P. vittata* má potenciál pre fytoremediáciu As touto cestou (napr. Fayiga and Ma 2005; Kertulis-Tartar et al. 2006) .

V štúdii Fayiga and Ma (2005), ktorá skúmala účinok *P. vittata* pri fytoextrakcii pri pôdach, ktoré boli znečistené rôznymi formami As, boli všetky rastliny pestované v skleníku. Po šiestich týždňoch bola koncentrácie As znížená okolo 20% v závislosti na typu pôdach. V jednotlivých pôdach bola . Potenciál tejto paprade pre fytoextrakciu arzénu potvrdil aj dlhodobý pokus Kertulis-Tartar et al. (2006). Počas dvoch rokov sa koncentrácia As v pôde

priemerne znížila o 26,3%, avšak zníženie koncentrácie As sa líšilo medzi rôznymi hĺbkami, čo sa dá vysvetliť, tým, že najbližšie k povrchu sa nachádza najviac koreňov. Autori Kertulis-Tartar et al. (2006) sa domnievajú na základe týchto výsledkov, že na úplné vyčistenie pôdy do hĺbky 15 cm by bolo potreba 8 rokov.

Fytoextrakcia pomocou *P. vittata* je veľmi dlhý proces, preto sa ďalšie štúdie zameriavajú na urýchlenie tohto procesu. Ako nádej na zrýchlenie „čistenia“ pôdy od As je pridanie fosforu do pôdy vo forme fosfátov, pretože fosfáty majú štruktúrnu analógiu k fosfátu a fosfátové transportéry sa veľkou mierou podieľajú na prijíme  $As^V$  z pôdy (Shin et al. 2004). Po pridaní P pomocou rozpustného hnojiva DAP (diamóniumfosfát) sa znížila koncentrácia As v pôde o 34% po dvoch rastových cykloch v skleníku. Pri kontrole sa znížila koncentrácia As len o 18%. Tieto výsledky naznačujú, že použitie DAP pri fytoextrakcii môže zvýšiť jej efektivitu, avšak sú nutné ďalšie pokusy v teréne (Mandal et al. 2012). V inej štúdii porovnávali dlhodobý účinok fosfátov na zvyšovanie efektivity fytoextrakcie As. V tejto štúdii Lessl et al. (2014), ktorá trvala 3,5 roka, porovnávali efektívnosť fytoextrakcie v pôdach s obsahom rozpustných fosfátových hnojív oproti pôdam s obsahom nerozpustnej fosfátovej horniny. Po 3,5 roku fytoextrakcie bola celková koncentrácia As vo všetkých použitých pôdach s obsahom nerozpustnej fosfátovej horniny o približne polovicu. Koncentrácie As v pôdach, ktoré boli ošetrované rozpustným fosfátovým hnojivom bola koncentrácia As znížená o cca 40%. Toto naznačuje, že z dlhodobého hľadiska je lepšie pre sanáciu As nerozpustná forma fosfátu.

#### 7.1.2. Rhizofiltrácia As

Aj keď je *P. vittata* suchozemská rastlina, bola použitá, ako najpreskúmanejší hyperakumulátor As, v rôznych pokusoch na odstraňovanie As z podzemných vôd. Vo všetkých týchto pokusoch boli rastliny pestované hydroponicky v kontaminovaných podzemných vodách, aby sa vyhodnotila ich účinnosť na odstraňovaní As z kontaminovaných vôd pod hranicu  $10 \mu g.l^{-1}$ , ktorá bola stanovená ako maximálna povolená hodnota pre pitnú vodu od USEPA a WHO. V štúdii Tu et al. (2004) poukázali, že stačí jedna rastlina *P. vittata* pestovaná v 600 ml znečistenej podzemnej vody s koncentráciou As  $46 \mu g.l^{-1}$ , aby efektívne znížila koncentráciu As na  $10 \mu g.l^{-1}$  za 3 dni. Zníženie koncentrácie v podzemnej vode dosiahlo 78,3%. V tomto pokuse taktiež zistili, že mladé zdravé rastliny (trojmesačné) rastliny dvakrát viac vychytávajú As ako staršie (ročné) rastliny v tej istej veľkosti, pretože príjem iónov mladými rastlinami je vyšší ako pri starších rastlinách.

V štúdii Natarajan et al. (2008), ktorá sa zameriavala na dôležitosť hustoty rastlín *P. vittata* a výživy na efektívnosť deplécie As z kontaminovaných spodných vôd, rastliny boli pestované v 30 litrovej nádobe s kontaminovanou vodou ( $130 \mu g.l^{-1}$ ) v rôznych počtoch. Ukázalo sa, že nízke koncentrácie fosforu (15%) napomáhajú k odstraňovaniu As s vody. Výsledky z tejto štúdie naznačujú, že pre krátkodobú fytofiltráciu vody kontaminovanej As môže vyššia hustota rastlín a nižšie hladiny P zvýšiť rýchlosť deplécie As (Natarajan et al. 2008). V štúdii Natarajan et al. (2011) autori zistili, že rýchlejšie čistia rastliny, ktoré majú už vyvinutý koreňový systém, koncentrácia As v kontaminovanej spodnej vode klesla zo 180 na  $>10 \mu g.l^{-1}$  za 6 týždňov, oproti tomu rastliny bez plne vyvinutého koreňového systému mali spodnú vodu, ktorá obsahovala na začiatku  $140 \mu g.l^{-1}$  As a na vyčistenie pod  $10 \mu g.l^{-1}$  potrebovali 8 týždňov. Tieto výsledky naznačujú, že staršie rastliny, ktoré majú dobre vyvinutý koreňový systém sú efektívnejšie pri vychytávaní arzénu z kontaminovaných vôd.

### 7.1.3. Likvidácia As po fytoremediácii

Je dôležité nájsť cestu ako zlikvidovať rastlinný materiál po fytoextrakcii a rhizofiltrácii, ktorý je bohatý na As bez poškodenia životného prostredia. V štúdiu Cao et al. (2010) autori poukázali na možnosť kompostácie rastlinného materiálu bohatého na As ako medzikrok pred likvidáciou rastlinného materiálu po fytoremediácii As. Napriek efektívnemu „čisteniu“ pôd alebo podzemných vôd As pomocou *P. vittata* výzva spočíva v efektívnej likvidácii zozbieranej biomasy. Pretože ak nebude dostatočne efektívna likvidácia, môže biomasa bohatá na As spôsobovať sekundárne znečistenie, a tým pádom by bola remediácia veľmi neefektívna. Preto by sa ďalšie výskumy mali zameriavať na efektívnu likvidáciu alebo recykláciu As bohatej biomasy (Fayiga and Saha 2016).

### 7.2 Využitie geneticky modifikovaných rastlín pre hyperakumuláciu/fytoremediáciu As

Prirodzené hyperakumulátory, ktoré sa využívajú na fytoremediáciu majú veľa nedostatkov (areál výskytu, malý rast biomasy, ukladanie As do častí, ktoré sa jedia, atď.), preto je výhodnejšie geneticky upravovať rastliny, aby sa tieto nedostatky zminimalizovali.

Podľa výsledkov rôznych štúdií, sa zdá, že vhodnou stratégiou pre zvýšenie akumulácie je zvýšenie príjmu arzenu pomocou rôznych transportérov napr. PHT1;1 (vysokoafinitný fosfátový transportér), kedy mutované rastliny *Arabidopsis* vykazovali dvojnásobnú akumuláciu As<sup>V</sup> (Catarcha et al. 2007). Transportér kyseliny kremičitej Lsi1 (NIP proteín) má hlavnú úlohu pri prijíme As<sup>III</sup> v rastlinách ryže, pretože rastliny, v ktorých bol knockoutovaný gén pre Lsi1 vykazovali oveľa nižšie koncentrácie As<sup>III</sup> ako nemutantné wildtype rastliny. Tieto výsledky nám naznačujú, že izoláciou a vnesením tohto génu do iných rastlín by mohlo viesť k zvýšenej akumulácii a tým pádom k efektívnejšej akumulácii (Ma et al. 2008). PvTIP4;1 (TIP proteín) z hyperakumulátora *P. vittata* bol vnesený do *A. thaliana* a tie vykazovali vyššiu akumuláciu As<sup>III</sup> ako nemutantné rastliny.

Vhodnou stratégiou pre vytváranie rastlín s hospodárskym využitím, ktoré netransportujú As do jedlých častí je použitie transgénnych rastlín ryže, ktoré majú knockoutovaný gén pre OsLsi2 (transportér kyseliny kremičitej), ktorý je zodpovedný za translokáciu As<sup>III</sup> do nadzemných častí rastlín a ryžových zŕn, ale nie je zodpovedný za príjem As<sup>III</sup>.

U baktérii sa ukázalo niekoľko mechanizmov, ktoré prispievajú k tolerancii As (Gadd 2019). Ukázalo sa, že hyperakumulátor *P. vittata* má podobné molekulárne mechanizmy na toleranciu voči As ako baktérie (Cai et al. 2019). V tomto experimente boli identifikované 3 gény *PvGAPC1* (glyceraldehyd 3-fosfátdehydrogenáza, ktorá má oveľa vyššiu afinitu k arzenátu ako k fosfátu), *PvOCT4* (transportér organických kationov, podieľa sa na metabolizme zachyteného arzenu), *PvGSTF1* (glutathion S-transferáza s arzenátoreduktázovou aktivitou), ktorých expresia je regulovaná prítomnosťou arzenu a sú potrebné pre toleranciu voči As. Znalosť týchto 3 génov nám poskytuje možnosť v budúcnosti geneticky manipulovať s rastlinami, aby sme dodali požadované vlastnosti pre fytoremediáciu (Cai et al. 2019). Gén *arsM* (gén pre bakteriálne S-adenosylmetyltransferázu zodpovednú za metyláciu a volatilizáciu As), ktorý je odvodený od baktérie *Rhodopseudomonas palustris* a bol inzertovaný do *Oryza sativa* cv. Nipponbare. Medzi rastlinami s vneseným génom a kontrolnými rastlinami nebol významný rozdiel medzi nárastom biomasy a celkovej akumulácie As, ale transgénne rastliny mali nižšiu akumuláciu As vo svojich koreňoch. Doteraz nie je identifikovaný rastlinný mechanizmus na metyláciu a volatilizáciu As. Aj keď výsledky tejto štúdie ukazujú len malé množstvo volatilizovaného As (0,06%), je tu možnosť optimalizovať expresiu a reguláciu *arsM*, tak aby technológia volatilizácie bola použiteľná aj



v praktickej fytoremediácii (Meng et al. 2011). Ďalší zaujímavý gén *ScACR3* (arzén reduktáza pre  $As^{III}$ , zodpovedný za eflux arzenitu) bol naklonovaný z *S. cerevisiae* expresia bola riadená pod 35S CaMV promotorom do *O. sativa* a tým sa zvýšila tolerancia rastlín ryže voči  $As^{III}$  (pri 40  $\mu M$  ošetroaní sa neukázali žiadne toxické účinky As). Koncentrácia As v koreňoch, nadzemných častiach rastliny a v zrnách bola znížená, čo je výhodné pre prevenciu vzniku ochorení spôsobenými toxicitou As. Na druhej strane takto vytvorená transgénna rastlina nemá potenciál pre fytoremediáciu, pretože bol zvýšený koreňový eflux  $As^{III}$  do substrátu (Duan et al. 2012). Ďalej bol izolovaný gén *AtACR2* (arzénreduktáza2, redukcia  $As^V$  na  $As^{III}$ ) z *Arabidopsis thaliana* a vnesený do tabaku a expresia riadená *pRbcS1a* (promotor malej podjednotky RUBISCA 1a). Takto vytvorené transgénne línie tabaku vykazovali vyššiu klíčivosť ako kontrolné netransgénne rastliny, a to najmä pri vyšších koncentráciách  $As^V$  (100 a 200  $\mu M$   $As^V$ ). Aj keď rast transgénnych rastlín aj kontrolných rastlín bol výrazne negatívne ovplyvnený  $As^V$ , tak mutantné rastliny boli napohľad zdravšie (listy mali zelenšie a vykazovali menej chlorózy), čo im umožnilo dozrieť a vytvoriť semená. Oproti tomu netransgénne rastliny zhnili. Suchá hmotnosť koreňov transgénnych rastlín bola až 6,5 krát vyššia ako pri netransgénnych rastlinách. Pri mutantných rastlinách bola nižšia akumulácia v nadzemných častiach rastliny ako pri netransgénnych rastlinách (28:40  $\mu g \cdot g^{-1}$  suchej hmotnosti), ale v koreňoch bola naopak vyššia (2400:2100  $\mu g \cdot g^{-1}$  suchej hmotnosti). Tieto výsledky naznačujú, že rastliny, do ktorých je vnesený gén *AtACR2*, môžeme využiť dvojitým spôsobom: môže byť využívaný pre fytoremediáciu, pretože sa zvýšila tolerancia voči  $As^V$  a taktiež sa zvýšil príjem  $As^V$ . A druhým spôsobom využitia je vytvorenie transgénnych línií hospodárskych rastlín, ktoré akumulujú relatívne menej arzenu do jedlých nadzemných častí rastlín (Nahar et al. 2017). Ďalším problémom je, že v zamorených oblastiach sa vyskytuje kontaminácia dvomi kovmi napríklad As a Cd, preto boli vyvinuté transgénne línie, ktoré sú účinné pri sanácii takto znečistených stanovišť (Rai et al. 2020). Po úspešnej transformácii génov *AsPCS1* (gén pre As fytochelanínreduktázu z cesnaku) a *ScYCF1* (vakuolárny ABC transportér GSH, zvyšujúci odolnosť voči Cd zo *Saccharomyces cerevisiae*) do *A. thaliana* vznikli dvojité mutanty, ktoré nemali poškodenú elongáciu koreňov na rozdiel od kontrolných netransgénnych rastlín, tieto výsledky nám naznačujú, že takéto mutanty majú vyššiu toleranciu k As aj Cd. Taktiež tieto dvojité mutanty vykazovali vyššiu akumuláciu As alebo Cd ako kontrolné netransgénne rastliny, a to vďaka zvýšenej syntéze fytochelátínov (dôležité pre detoxikáciu viz vyššie). Dvojité mutanty boli porovnávané okrem netransgénnych rastlín aj s jednoduchými mutantami, ktoré mali vnesený buď gén *AsPCS1*, alebo gén *ScYCF1*. A tieto dvojité mutanty vykazovali lepšie výsledky (či už pri elongácii koreňov alebo akumulácii), čo nám naznačuje, že takto vytvorené dvojité mutanty majú perspektívu pre využívaní vo fytoremediáčnych technikách (Guo et al. 2012).

## 8. Záver

Kontaminácia prostredia arzénom je veľký problém takmer v celom svete. Pomocou rastlín sa tento ťažký kov môže dostávať do potravinového reťazca a spôsobovať ťažké patológie u živočíchov aj ľudí. Rastliny, ktoré žijú v takto kontaminovanom prostredí sa sami musia vysporiadať s fytotoxickým účinkom arzénu rôznymi mechanizmami. Odolnosť voči arzénu je veľmi špecifická medzi druhovo a pri hospodárskych plodinách dokonca je odolnosť rozdielna aj pri rôznych varietach týchto plodín. Hyperakumulátory sú rastliny, ktoré dokážu prežiť v prostredí s nadmerne vysokými koncentraciami ťažkých kovov, akumulujú ťažké kovy do nadzemných častí rastlín v omnoho vyšších koncentráciách ako sa vyskytuje v pôde alebo nehyperakumulujúcich rastlinách. Vďaka týmto vlastnostiam ich môžeme využívať pri čistení kontaminovaných pôd alebo vôd pomocou sanačnej techniky, ktorá sa nazýva fytoremediácia.

Vo svojej práci som sa snažil zhrnúť všetky poznatky ohľadom fytotoxicity arzénu, hyperakumulátorov a ich využitie pri rôznych fytoremediácii arzénu. Zatiaľ všetky objavené arzénové hyperakumulátory majú svoje nedostatky, ako je napríklad úzka ekologická nika, pomalý rast alebo malý objem biomasy. Tieto nedostatky vedú k tomu, že efektívnosť fytoremediačných techník častokrát nedosahuje efektívnosti konvenčných sanačných techník. Nádejnou alternatívou k hľadaniu ideálneho prirodzeného hyperakumulátora je geneticky modifikovať rastliny, ktoré by mali vlastnosti zvyšujúce efektívnosť fytoremediácie.

## Literatúra

- Abbas G, Murtaza B, Bibi I, et al (2018) Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: Physiological, biochemical, and molecular aspects. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15
- Abedin MJ, Meharg AA (2002) Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 243:57–66.  
<https://doi.org/10.1023/A:1019918100451>
- Abernathy C, Chakraborti D, Edmonds JS, et al (2001) Environmental health criteria for arsenic and arsenic compounds. *Environ. Heal. Criteria*
- Austruy A, Wanat N, Moussard C, et al (2013) Physiological impacts of soil pollution and arsenic uptake in three plant species: *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum* and *Vicia faba*. *Ecotoxicol Environ Saf* 90:28–34. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2012.12.008>
- Azizur Rahman M, Hasegawa H, Mahfuzur Rahman M, et al (2007) Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* 67:1072–1079.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.11.061>
- Biswas JK, Warke M, Datta R, Sarkar D (2020) Is Arsenic in Rice a Major Human Health Concern? *Curr. Pollut. Reports* 6
- Cai C, Lanman NA, Withers KA, et al (2019) Three Genes Define a Bacterial-Like Arsenic Tolerance Mechanism in the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris vittata*. *Curr Biol* 29:.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.029>
- Cao X, Ma L, Shiralipour A, Harris W (2010) Biomass reduction and arsenic transformation during composting of arsenic-rich hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ Sci Pollut Res.*  
<https://doi.org/10.1007/s11356-009-0204-7>
- Carbonell-Barrachina AA, Burló F, Burgos-Hernández A, et al (1997) The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Sci Hortic (Amsterdam)* 71:167–176. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00114-3)
- Carey AM, Scheckel KG, Lombi E, et al (2010) Grain unloading of arsenic species in rice. *Plant Physiol* 152:.  
<https://doi.org/10.1104/pp.109.146126>
- Catarecha P, Segura MD, Franco-Zorrilla JM, et al (2007) A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* 19:.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.041871>
- Deng F, Yamaji N, Ma JF, et al (2018) Engineering rice with lower grain arsenic. *Plant Biotechnol J* 16:.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.12905>
- Duan G-L, Zhu Y-G, Tong Y-P, et al (2005) Characterization of Arsenate Reductase in the Extract of Roots and Fronds of Chinese Brake Fern, an Arsenic Hyperaccumulator. *Plant Physiol* 138:461 LP – 469. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057422>
- Duan G, Kamiya T, Ishikawa S, et al (2012) Expressing ScACR3 in rice enhanced arsenite efflux and reduced arsenic accumulation in rice grains. *Plant Cell Physiol* 53:.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcr161>
- Duffus JH (2002) “heavy metals” - A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem.*  
<https://doi.org/10.1351/pac200274050793>
- Fayiga AO, Ma LQ (2005) Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic

- contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* <https://doi.org/10.1007/s11270-005-0612-3>
- Fayiga AO, Saha UK (2016) Arsenic hyperaccumulating fern: Implications for remediation of arsenic contaminated soils. *Geoderma*
- Finnegan PM, Chen W (2012) Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Front Physiol* 3 JUN: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>
- Francesconi K, Visoottiviset P, Sridokchan W, Goessler W (2002) Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Sci Total Environ* 284:27–35. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00854-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00854-3)
- Gadd GM (2019) Arsenic Toxicity: An Arsenic-Hyperaccumulating Fern Uses a Bacterial-like Tolerance Mechanism. *Curr. Biol.* 29
- Ghosh S, Shaw AK, Azahar I, et al (2016) Arsenate (AsV) stress response in maize (*Zea mays* L.). *Environ Exp Bot* 130:53–67. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2016.05.003>
- Guo J, Xu W, Ma M (2012) The assembly of metals chelation by thiols and vacuolar compartmentalization conferred increased tolerance to and accumulation of cadmium and arsenic in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J Hazard Mater* 199–200: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.008>
- Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J (2013) Arsenate and arsenite: The toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiol Plant.* <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1159-8>
- Haug CM, Reimer KJ, Cullen WR (2004) Arsenic uptake by the Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesie*). In: *Applied Organometallic Chemistry*
- He Z, Yan H, Chen Y, et al (2016) An aquaporin PvTIP4;1 from *Pteris vittata* may mediate arsenite uptake. *New Phytol* 209: <https://doi.org/10.1111/nph.13637>
- Jedynak L, Kowalska J, Kossykowska M, Golimowski J (2010) Studies on the uptake of different arsenic forms and the influence of sample pretreatment on arsenic speciation in White mustard (*Sinapis alba*). *Microchem J* 94:125–129. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2009.10.001>
- Kertulis-Tartar GM, Ma LQ, Tu C, Chirenje T (2006) Phytoremediation of an arsenic-contaminated site using *Pteris vittata* L.: A two-year study. *Int J Phytoremediation* 8:311–322. <https://doi.org/10.1080/15226510600992873>
- Kofroňová M, Hrdinová A, Mašková P, et al (2019) Strong antioxidant capacity of horseradish hairy root cultures under arsenic stress indicates the possible use of *Armoracia rusticana* plants for phytoremediation. *Ecotoxicol Environ Saf* 174:295–304. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.028>
- Kofroňová M, Hrdinová A, Mašková P, et al (2020) Multi-component antioxidative system and robust carbohydrate status, the essence of plant arsenic tolerance. *Antioxidants* 9: <https://doi.org/10.3390/antiox9040283>
- Kofroňová M, Mašková P, Lipavská H (2018) Two facets of world arsenic problem solution: crop poisoning restriction and enforcement of phytoremediation. *Planta*
- Krämer U (2010) Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:517–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156>
- Lessl JT, Luo J, Ma LQ (2014) *Pteris vittata* continuously removed arsenic from non-labile fraction in

- three contaminated-soils during 3.5 years of phytoextraction. *J Hazard Mater.*  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.056>
- Letierrier M, Airaki M, Palma JM, et al (2012) Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environ Pollut* 166:136–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.012>
- Li N, Wang J, Song WY (2016) Arsenic uptake and translocation in plants. *Plant Cell Physiol.* 57:4–13
- Lombi E, Tearall KL, Howarth JR, et al (2002) Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 128:.  
<https://doi.org/10.1104/pp.010731>
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, et al (2008) Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9931–5.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0802361105>
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, et al (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic - A hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature.*  
<https://doi.org/10.1038/35054664>
- Mahdih S, Ghaderian SM, Karimi N (2013) EFFECT OF ARSENIC ON GERMINATION, PHOTOSYNTHESIS AND GROWTH PARAMETERS OF TWO WINTER WHEAT VARIETIES IN IRAN. *J Plant Nutr.*  
<https://doi.org/10.1080/01904167.2012.754036>
- Mandal A, Purakayastha TJ, Patra AK, Sanyal SK (2012) Phytoremediation of arsenic contaminated soil by *Pteris Vittata* L. I. Influence of phosphatic fertilizers and repeated harvests. *Int J Phytoremediation.* <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.649433>
- Mandal BK, Suzuki KT (2002) Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58:201–235.  
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0)
- Meng XY, Qin J, Wang LH, et al (2011) Arsenic biotransformation and volatilization in transgenic rice. *New Phytol* 191:.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03743.x>
- Muhammad AI, Muhammad NC, Rass MK, et al (2013) Toxicity of arsenic (As) on seed germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Int J Phys Sci* 8:840–847.  
<https://doi.org/10.5897/ijps2013.3894>
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environ. Chem. Lett.* 8:199–216
- Nahar N, Rahman A, Nawani NN, et al (2017) Phytoremediation of arsenic from the contaminated soil using transgenic tobacco plants expressing ACR2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 218:.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.08.001>
- Natarajan S, Stamps RH, Ma LQ, et al (2011) Phytoremediation of arsenic-contaminated groundwater using arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.: Effects of frond harvesting regimes and arsenic levels in refill water. *J Hazard Mater* 185:.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.002>
- Natarajan S, Stamps RH, Saha UK, Ma LQ (2008) Phytoremediation of arsenic-contaminated groundwater using *Pteris vittata* L.: Effect of plant density and nitrogen and phosphorus levels. *Int J Phytoremediation* 10:222–235. <https://doi.org/10.1080/15226510801997754>
- Naumann B, Eberius M, Appenroth K-J (2007) Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. *J Plant Physiol* 164:1656–1664.  
<https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2006.10.011>

- Nelson KW (1977) Industrial contributions of arsenic to the environment. *Environ Health Perspect.* <https://doi.org/10.2307/3428447>
- Paivoke A (1983) The long-term effects of lead and arsenate on the growth and development, chlorophyll content and nitrogen fixation of the garden pea. *Ann Bot Fenn* 20:297–306
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:15–39
- Pita-Barbosa A, Williams TCR, Loureiro ME (2019) Effects of short-term arsenic exposure in *Arabidopsis thaliana*: Tolerance versus toxicity responses. *Biol Plant.* <https://doi.org/10.32615/bp.2019.006>
- Rai PK, Kim KH, Lee SS, Lee JH (2020) Molecular mechanisms in phytoremediation of environmental contaminants and prospects of engineered transgenic plants/microbes. *Sci Total Environ* 705:.. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135858>
- Reeves RD, Baker AJM, Jaffré T, et al (2018) A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytol.* 218:407–411
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot* 2012:1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shin H, Shin HS, Dewbre GR, Harrison MJ (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* 39:629–642. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02161.x>
- Siddiqui F, Krishna SK, Tandon PK, Srivastava S (2013) Arsenic accumulation in *Ocimum* spp. and its effect on growth and oil constituents. *Acta Physiol Plant.* <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1145-1>
- Singh R, Gautam N, Mishra A, Gupta R (2011) Heavy metals and living systems: An overview. *Indian J. Pharmacol.* 43:246–253
- Song W-Y, Park J, Mendoza-Cózatl DG, et al (2010) Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc Natl Acad Sci* 107:21187–21192. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1013964107>
- Song W-Y, Yamaki T, Yamaji N, et al (2014) A rice ABC transporter, OsABCC1, reduces arsenic accumulation in the grain. *Proc Natl Acad Sci* 111:15699–15704. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1414968111>
- Souri Z, Karimi N, Sandalio LM (2017) Arsenic hyperaccumulation strategies: An overview. *Front. Cell Dev. Biol.*
- Stoeva N, Berova M, Zlatev Z (2005) Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biol Plant.* <https://doi.org/10.1007/s10535-005-3296-z>
- Tu S, Ma LQ, Fayiga AO, Zillioux EJ (2004) Phytoremediation of arsenic-contaminated groundwater by the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. *Int J Phytoremediation* 6:35–47. <https://doi.org/10.1080/16226510490439972>
- van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, et al (2013) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil.* <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>
- Vara Prasad MN, de Oliveira Freitas HM (2003) Metal hyperaccumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol* 6:285–321
- Wu Z, Ren H, Mcgrath SP, et al (2011) Investigating the contribution of the phosphate transport

pathway to arsenic accumulation in rice. *Plant Physiol* 157:.  
<https://doi.org/10.1104/pp.111.178921>

Xu W, Dai W, Yan H, et al (2015) *Arabidopsis* NIP3;1 Plays an Important Role in Arsenic Uptake and Root-to-Shoot Translocation under Arsenite Stress Conditions. *Mol Plant* 8:722–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.005>

Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2002) Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytol* 156:27–31. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00493.x>

Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol*.