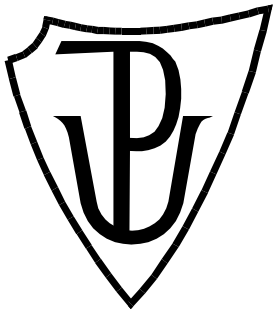
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Variabilita schopnosti asimilace těžkých kovů u *Cannabis sativa*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ondřej Vrobel
Studijní program:	R1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok:	2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že na moji práci se vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 12. 5. 2017

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Petru Tarkowskému Ph.D. za odborné rady, připomínky a především za trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Poděkovaní taktéž patří Mgr. Monice Jarošové, Ph.D. a Mgr. Rostislavu Halouzkovi za odborné rady a pomoc. Taktéž bych chtěl poděkovat institucím CRH, VÚRV a RCPTM za poskytnutý prostor a prostředky k vypracování bakalářské práce.

Biobliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Ondřej Vrobel
Název práce	Variabilita schopnosti asimilace těžkých kovů u konopí setého
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra Biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Teoretická část práce se zabývá fytoremediací, zejména tedy molekulárním mechanismům. Dále je věnována konopí setému jako rostlině s potenciálním využitím v současné fytoremediaci. Následně jsou popsány metody vhodné pro stanovení těžkých kovů. Experimentální část práce se zaměřuje na stanovení kovových a polokovových prvků metodou ICP-MS ve vzorcích konopí setého a uvedení do kontrastu s uzákoněnými normami a limity. Součástí práce je vyhodnocení a srovnání fytoremediačních kapacit dvou povolených odrůd technického konopí. Rostliny konopí byly kultivovány v kontrolovaných podmínkách, v kultivačních roztocích a ošetřeny roztokem těžkých kovů. Ačkoli rozlišné parametry analyzovaných rostlin naznačovaly výrazný rozdíl v extrakci kovů není mezi odrůdami stanoven významný rozdíl.

Klíčová slova	Fytoremediace, konopí seté, těžké kovy, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Ondřej Vrobel
Title	Variability of assimilation ability of heavy metals in Cannabis sativa
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

Teoretical part of thesis is dedicated to phytoremediation, mainly is focused on molecular mechanisms. Further is describing Cannabis sativa as a potential energy plant in current phytoremediation. Lastly are described methods for determination of heavy metals. In first part of experimental part of thesis chosen heavy metals and metaloids were determined using ICP-MS in C. sativa samples. Concentrations were compared with current legal norms and limit. Second part of experimental part compares phytoextraction capacities of two allowed subspecies of industrial hemp. Plants were cultivated in controlled conditions, in nutrition solutions and heavy metal treatment was realized. Although different parameters of analysed plant suggested significant difference in heavy metal uptake in the end both subspecies extracted similar amounts of metals.

Key words	Phytoremediation, Cannabis sativa, heavy metals, inductively coupled plasma mass spectrometry
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce:

1. Vypracovat literární rešerši s klíčovými slovy: těžké kovy, fytoremediace, konopí, metody stanovení těžkých kovů.
2. Stanovení obsahu vybraných těžkých kovů ve vzorcích technického konopí pomocí ICP-MS.
3. Porovnání fytoremediačních schopností dvou odrůd technického konopí.

Obsah

1 Úvod....8
2 Současný stav řešené problematiky....9
2.1 Fytoremediace....9
2.1.1 Fytoextrakce....10
2.1.1.1 Kontinuální fytoextrakce....11
2.1.1.2 Indukovaná fytoextrakce....12
2.1.1.3 Mechanismy....13
2.1.2 Fytovolatilizace....16
2.1.3 Fytostabilizace....17
2.1.4 Fytofiltrace....17
2.2 Konopí seté....18
2.2.1 Technické konopí....19
2.2.2 Medicinální využití....19
2.2.3 Potenciál konopí ve fytoremediaci....21
2.2.4 Legislativa....22
2.3 Metody stanovení těžkých kovů....22
2.3.1 Atomová absorpční spektrometrie....22
2.3.2 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem....24
3 Experimentální část....26
3.1 Materiál a přístroje....26
3.1.1 Chemikálie....26
3.1.1.1 Biologický materiál....27
3.1.2 Přístrojové vybavení a pomůcky....27
3.2 Metody....28
3.2.1 Kultivace rostlin....28
3.2.2 Příprava kultivačních roztoků....28
3.2.2.1 Kultivační roztok podle Hoaglanda....28
3.2.2.2 Roztok těžkých kovů....28
3.2.2.3 Příprava roztoku Fe(EDTA)....29
3.2.3 Zpracování rostlinného materiálu....30
3.2.4 Příprava kalibrační řady....30
3.2.5 Prvková analýza....31
3.2.6 Vyhodnocení....31
4 Výsledky a diskuze....32
4.1 Stanovení vybraných kovů v konopí....32
4.2 Vyhodnocení růstu rostlin....34
4.3 Distribuce kadmia....36
4.4 Distribuce olova....36
4.5 Potenciál odrůd....37
5 Závěr....39
6 Seznam použité literatury....40
7 Seznam použitých zkratek....43

1 ÚVOD

Kontaminace půd představuje dlouhodobé riziko. Anorganické polutanty nemohou být degradovány a zůstávají v půdě dokud nedojde k jejich prosáknutí do spodních vod nebo se nedostanou do potravního řetězce. Prostoupením potravním řetězcem se dostávají i do lidské populace. V lidských buňkách potom způsobují oxidativní stres a mutagenezi lidského genetického kódu. Snaha o dekontaminaci půd se nazývá remediace.

K remediaci lze přistoupit několika směry, existují nákladné metody zahrnující exkavaci půd a jejich chemické zpracování. Tato cesta však neposkytuje vhodné východisko vzhledem k tomu, že dochází k narušení struktury půdy. Bioremediační techniky ve svém procesu zahrnují živé organismy, fytoremediace využívá rostliny k dekontaminaci. Fytoextrakce je založena na principu, že rostliny akumulují v pletivech těžké kovy. Sklízením a odborným zpracováním lze těžké kovy extrahovat z půdy a nenarušit tak její struktury a funkci. Významným faktorem je cena a fytoremediační techniky se řadí mezi ty nejlevnější.

K fytoextrakci je vhodná jen hrstka rostlin a jednou z nich je konopí seté. Jako rychle rostoucí rostlina schopná tolerovat vysoké koncentrace těžkých kovů je vhodná pro extrakci velkého množství kovů z půdy. Taktéž umožňuje využití kontaminovaných půd alespoň pro výrobu vláken nebo biopaliv.

Tato práce se zabývá schopností konopí extrahovat těžké kovy a ukládat je do svých pletiv. Součástí je práce je stanovení mnoha kovových a polokovových prvků ve vzorcích konopí.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Fytoremediace

Remediace je pojetím řady technologií, které si společně kladou za cíl navrácení znečištěných půd do původního stavu. Způsobů jak půdu zbavit polutantů existuje velké množství, metody utilizující rostliny a přidružené mikroorganismy rhizosféry lze nazvat jako fytoremediační. Oproti industriálním metodám se vyznačují výrazně nižší náročností na finanční prostředky. Běžné postupy zahrnují nákladnou exkavaci, transport a chemické zpracování půd. U fytoremediačních metod jsou prostředky vynakládány na průběžné analýzy a případné zpracování biologického materiálu (Kopstik, 2014).

První myšlenky o využití rostlin k dekontaminaci znečištěných půd vznikly v osmdesátých letech minulého století. Od té doby bylo sledována řada modelových remediačních technik (Lasat, 2002). V poslední době vyvstává používání energetických plodin pro fytoremediaci. Ta je i přes svoji nízkou nákladnost časově velmi náročná a nepřináší zisk z rozsáhlých kontaminovaných oblastí. Vhodné energetické plodiny mají jako druhý účel produkci biomasy pro tvorbu biopaliv či produkci cenných metabolitů jako například ricinový olej (Pandey *et al.* 2015).

Účinnost fytoremediace je podmíněna několika aspekty, a to fyzikálními, chemickými a biologickými. Mezi fyzikální aspekty lze zařadit hloubku, do které jsou půdy kontaminovány, a zejména strukturou samotné zeminy, písčité zeminy neefektivně zadržují vodu a tím snižují biologickou dostupnost iontů kovů. Jílovité půdy s nízkým podílem organické složky taktéž představují problém, zadržování velkého množství vody omezuje příjem kyslíku rostlinám v nich pěstovaných. Z chemického hlediska je biologická dostupnost ovlivněna faktory jako jsou pH zeminy, koncentrace kyslíku a samotná povaha iontu kovu. Kyselé pH půdy umožňuje rostlinám asimilaci iontů kovů, vápněním půd je tento proces významně omezen a dochází k imobilizaci kovových iontů. Imobilizační procedury poskytují východisko pro agrikulturní půdy pouze po krátkou dobu, jelikož polutanty zůstávají dále v půdě. Každý kov se jiným způsobem váže na pevnou složku v půdě, některé jsou snadno rozpustné a některé jsou téměř nerozpustné což výrazně omezuje jejich biologickou dostupnost. Z biologického hlediska biologickou dostupnost kovů nejvíce ovlivňují bakterie, houby a vyšší rostliny.

Značně modifikují chemické a fyzikální vlastnosti půdy. Mikroorganismy acidifikují půdu, syntetizují chelatační činidla, převádí fosfáty do vodného roztoku a vykonávají redoxní změny. Rozsáhlý kořenový systém vyšších rostlin výrazně mění pH ve svém blízkém okolí. Membránové transportéry zvyšují extracelulární koncentraci protonů a přijímají zpět ionty kovů (Ernst, 1996).

Využití živých organismů oproti běžným remediačním metodám poskytuje výhodu, že nedochází k významnému narušení struktury a funkce půd. Polutanty organického charakteru mohou být degradovány živými organismy, kdežto těžké kovy degradovány nejsou. Rostliny pěstované v zasažených umožňují s těžkými kovy operovat, mohou být stabilizovány v oblastech kořenového systému, zabudovány do pletiv nebo případně uvolněny do atmosféry v plynné formě. Asimilace kovů je přirozenou schopností rostlin a zejména se jedná o esenciální ionty kovů železa, mědi, molybdenu, kobaltu, niklu, manganu a zinku. Přijímány jsou i ionty kovů olova, kadmia, rtuti a polokovu arsenu, které nemají známé fyziologické aktivity (Lasat, 2002).

2.1.1 Fytoextrakce

Jedná se o nejvýznamější fytoremediační metodu, často jsou pojmy fytoremediace a fytoextrakce mylně považovány za synonyma. Proces spočívá v akumulaci těžkých kovů v pletivech rostlin. Akumulace je dosaženo dvěma základními strategiemi, kterým je věnována pozornost. Jednou z nich je kontinuální (přirozená) fytoextrakce a druhou z nich je fytoextrakce indukovaná. Z fytoremediačních metod poskytuje extrakce možnost kvantitativního stanovení extrahovaných polutantů, což ostatní fytoremediační metody neumožňují (Salt *et al.,* 1998).

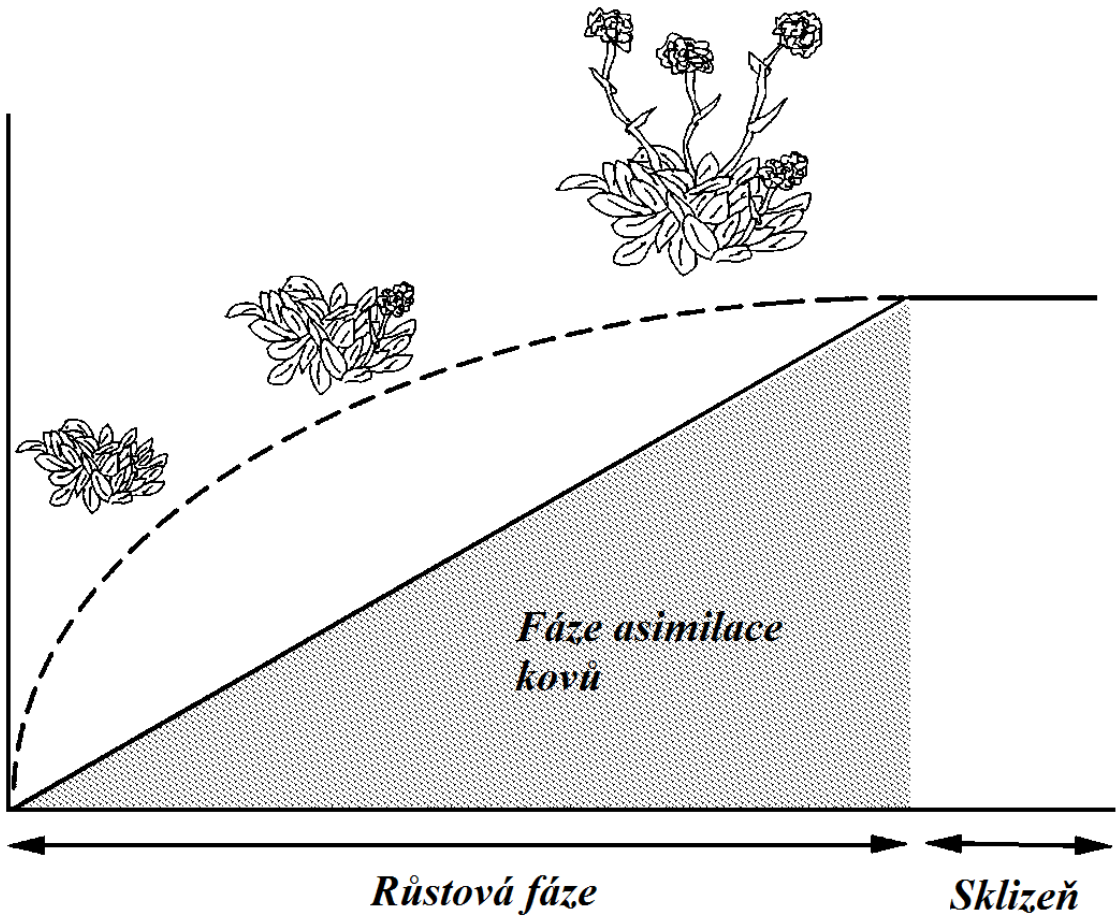
Volba vhodných rostlin je klíčová. Požadovaná kritéria u těchto rostlin jsou tolerance vysokých koncentrací polutantů, schopnost akumulovat několik různých kovů ve vysokých koncentracích do pletiv, produkovat velké množství biomasy, rychlý růst, odolnost vůči škůdcům a pesticidům, rozsáhlý kořenový systém a taktéž schopnost transportovat akumulované ionty z kořenů do prýtu. Důležitá je taktéž nezajímavost rostliny pro býložravce, čímž je předcházeno kontaminaci potravního řetězce (Thangavel a Subbhuraam, 2004).

Výhodou fytoextrakce je její nízká nákladnost, možnost aplikace na rozsáhlé množství polutantů v různých koncentracích, minimální narušení prostředí a funkce půdy. Jako

každá jiná metoda s sebou nese i nevýhody jako například časová náročnost, potenciální kontaminace potravního řetězce, hledání a šlechtění vhodných rostlin, nákladná příprava transgenních rostlin s vyšší účinností (Thangavel a Subbhuraam, 2004).

2.1.1.1 Kontinuální fytoextrakce

Účinnost této metody zcela spočívá v přirozené schopnosti rostlin extrahovat a akumulovat těžké kovy ve svých pletivech. Kovy jsou přijímány po celou dobu růstového cyklu rostliny (obr. 1). A tato schopnost je dána genetickou predispozicí jednotlivých druhů, pro tuto konkrétní strategii jsou využívány hyperakumulující rostliny (kapitola 2.1.1.3 Mechanismy), které dokáží přirozeně akumulovat značné množství těžkých kovů. Značnou nevýhodou těchto rostlin, že nevytváří velké množství biomasy a rostou pomalu. Výzkum zaobírající se těmito rostlinami však umožňuje

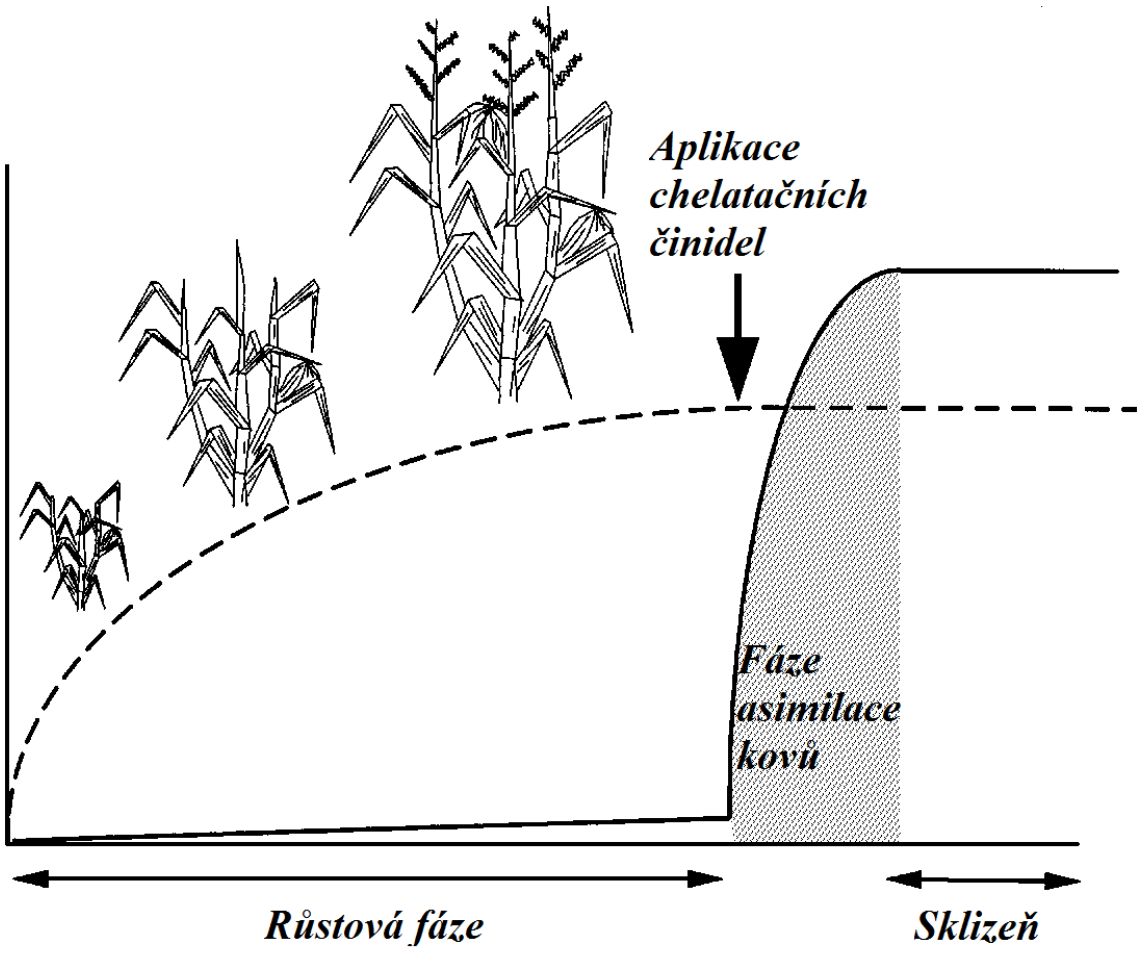


Obr. 1: Reprezentace kontinuální fytoextrakce (převzato a upraveno ze Salt *et al.*, 1998), nepřerušovaná čára reprezentuje množství extrahovaných kovů, přerušovaná čára reprezentuje množství biomasy.

pochopit mechanismy příjmu a transportu v rostlině a dává základ pro vytvoření účinějších transgenních rostlin (Salt *et al.*, 1998).

2.1.1.2 Indukovaná fytoextrakce

Podporování extrakce spočívá v přidávání chemických aditiv k rostlinám, mohou to být látky kyselé povahy, ale hlavně se jedná o chelatační činidla (obr. 2). Problémem fytoremediace některých kovů je, že jsou obtížně rozpustné a zůstávají pevně vázané na pevnou složku půdy. Chelatační činidla zajišťují snažší přechod kovů do vodného roztoku, čímž je podporována jejich biologická dostupnost a v samotné rostlině chelatované ionty nevykazují tak vysokou toxicitu jako ionty nechalatované. Taktéž je podpořena translokační efektivita a ionty kovů jsou tak xylémem transportovány do prýtu ve větší míře. Aplikace chelatačních činidel s sebou však nese riziko, při kterém může dojít k prosáknutí rozpuštěných těžkých kovů do spodních vod. Mezi



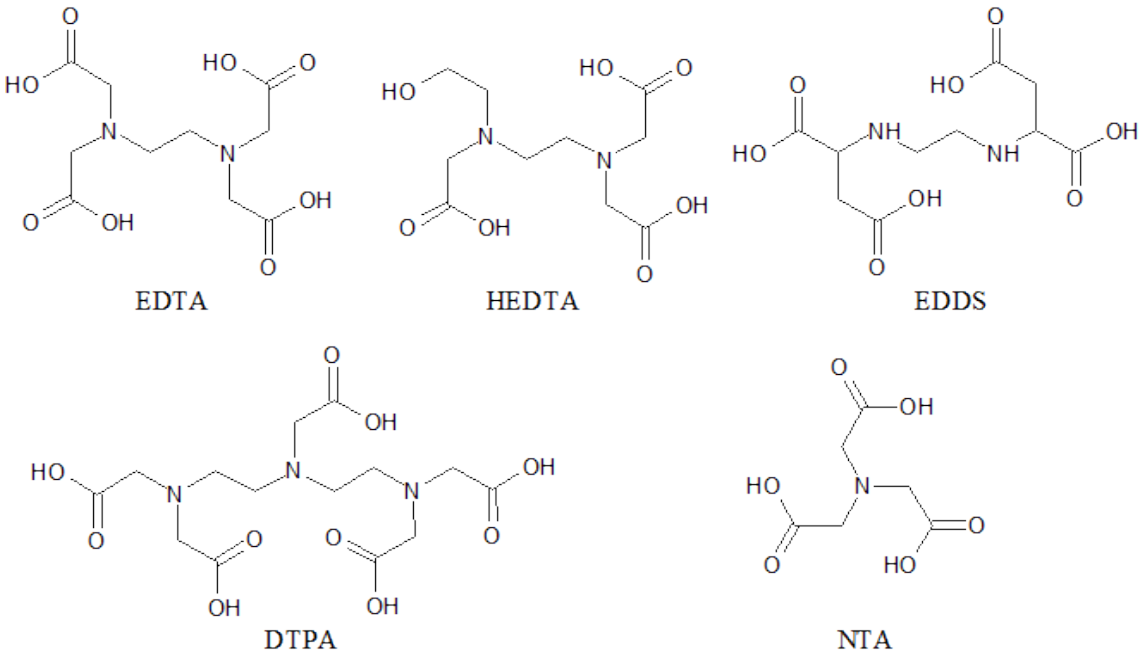
Obr. 2: Znázornění indukované fytoextrakce přídavkem chelatačního činidla (převzato a upraveno ze Salt et al., 1998), nepřerušovaná čára reprezentuje množství extrahovaných kovů, přerušovaná čára reprezentuje množství biomasy.

testovanými syntetickými chelatačními činidly (strukturní vzorce v obr. 3) jsou účinné například EDTA, HEDTA a DTPA, nicméně jejich účinek je závislý na druhu použité rostliny. Mikroorganismy jsou vytvářeny i odbourávány přírodní chelatační činidla, a to EDDS či NTA (Evangelou *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Mechanismy

Z hlediska fytoremediace lze vyčlenit tři významné skupiny rostlin. Rostliny neakumulující těžké kovy, které se aktivně podílí na zabránění vstupu kovů do buněk kořenového systému, což je vhodným základem pro fytostabilizaci. Indikátory reprezentující koncentrace kovů v pletivech stejné jako v půdách a na akumulátory, které se aktivně podílí na příjmu a transportu kovů do prýtu rostlin. Známé hyperakumulátory jsou druhy, které rostou na půdách běžných tak i na půdách s vysokou dostupností mikronutrientů. Právě tato vysoká dostupnost kovů pravděpodobně podpořila adaptaci na náročné podmínky (Bhargava *et al.*, 2012).

Akumulace kovů rostlinami je selektivní, některé kovy jsou preferovány více než jiné, a to zejména esenciální mikronutrienty. Hyperakumulující terestrální rostliny jsou vzácným fenoménem. Pouze pod 1 % krytosemenných rostlin bylo definováno jako hyperakumulátory. Objevení první hyperakumulující rostliny se datuje do doby konce



Obr. 3: Strukturní vzorce chelatačních činidel EDDS, EDTA (převzato z Morrison a Khutoryanskiy, 2014), HEDTA, NTA (převzato z Li *et al.*, 2016) a DTPA (převzato z Caravan *et al*. 1999).

19. stolení, kdy Baumann v rostlině *Thlaspi calaminare* stanovil vysoké koncentrace zinku (Bhargava *et al.*, 2012).

Definování hyperakumulujících je postaveno na prahových hodnotách koncentrací kovů v pletivech rostlin. Jedny z těchto hodnot v sušinách jsou například 10 000 $mg \cdot kg^{-1}$ pro zinek a mangan, 1 000 $mg \cdot kg^{-1}$ pro kobalt, nikl, měď, arsen a selen a 100 $mg \cdot kg^{-1}$ pro kadmium (McGrath a Zhao, 2003).

Tolerance vysokých koncentrací kovů u hyperakumulátorů je zajištěna vnitřní sekvestrací. Ochrana proti toxicitě kovů je zajištěna několika různými mechanismy, například vázání kovů k buněčné stěně, exudáty z kořenů, chelatace kovů v cytosolu buněk karboxylovými kyselinami, aminokyselinami, fytochelatiny, metalotioneiny a proteiny vázající kovy, reparací stresem poškozených proteinů a nebo kompartmentací do vakuoly tonoplastovými transportéry (Yang *et al*. 2005).

Pokud nejsou účinky kovů některým mechanismem eliminovány nebo zmírněny dochází k poškození buněk. Mezi symptomy se řadí zpomalený růst rostliny, chloróza, omezená schopnost fotosyntézy, peroxidace lipidů, indukovaná proteolýza a narušení poměru mezi ROS a antioxidanty často vyúsťující v buněčnou smrt (Luo *et al*., 2016).

Kořenový systém uvolňuje do svého okolí vysokomolekulární látky, jako polysacharidy a enzymy, nízkomolekulární látky, kupříkladu organické kyseliny, sacharidy, fenoly a aminokyseliny. Tyto látky ovlivňují rozpustnost i mobilitu iontů. Vylučované látky slouží jako ligandy těžkých kovů a taktéž jako energetický zdroj pro přidružené mikroorganismy (Dong *et al*., 2007).

Ionty kovů jsou vázány mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou. Na vázání kovů se podílí karboxylové skupiny, hydroxylové skupiny a thiolové skupiny. Nedílná složka buněčné stěny, pektin, se významně podílí, některé rostliny v případě vyšší koncentrace kovů zvyšují produkci pektinu (Colzi *et al*., 2011). Meyers (*et al*. 2008) tvrdí, že vázání olovnatých kationtů k buněčné stěně je nejvýznamější interakce pro potlačení jejich toxických efektů společně se sekvestrací ve vakuole.

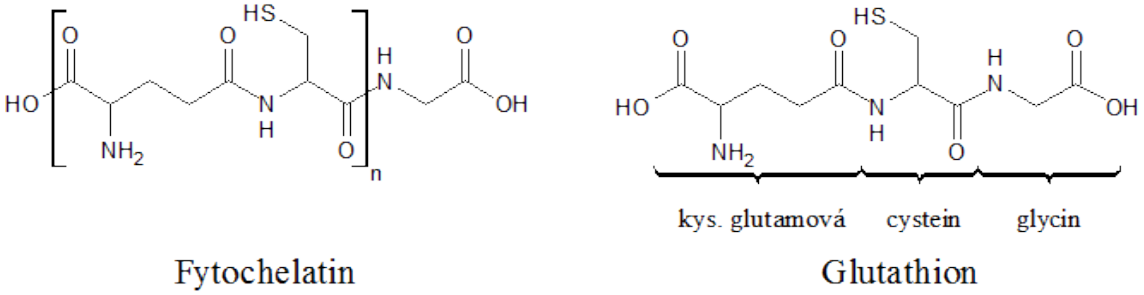
Jedním z mechanismů zajišťující toleranci kovů je produkce chelatačních činidel v cytosolu buněk. Významnými složkami jsou fytochelatiny (obr. 4), jedná se o peptidy s častým zastoupením cysteinu ve své struktuře. Fytochelatiny nejsou kódovány genetickou informací nýbrž vznikají řetězením prekurzoru, redukovaného glutathionu.

Jejich syntéza je indukována přítomností řady těžkých kovů (Ag, Au, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn) a po komplexaci dochází k jejich transportu do vakuoly. Metalotioneiny jsou taktéž neproteinové peptidy bohaté na cystein. Na rozdíl od fytochelatinů není jejich tvorba indukována pouze abiotickým stresem, ale jsou tvořeny i během vývoje rostlin. Indukce je způsobena přirozenou senescencí, fytohormony, mechanickým poškozením, virovou infekcí, UV zářením nebo nedostatkem živin (Kushwaha *et al*., 2016).

Glutathion neslouží pouze jako prekurzor fytochelatinů, ale je syntetizován především za účelem kontroly oxidativního stresu, který je mimo jiné způsoben přítomností těžkých kovů, které se na tomto ději podílí přímo nebo nepřímo ovlivněním metabolických procesů v rostlině (Yadav, 2010).

Ionty kovů jsou z cytosolu buď vyloučeny do extracelulárního prostoru, což je opět jeden z několika obranných mechanismů nebo jsou transportovány přes tonoplast do vakuoly. Kompartmentilizace těžkých kovů ve vakuole taktéž zajišťuje eliminaci toxických účinků a na transportu se podílí membránové transportéry. Jejich zvýšená exprese v transgenních rostlinách má za účinek vyšší odolnost rostlin vystaveným vysokým koncentracím kovů (Tong *et al*., 2004).

Transport kovů probíhá převáže symplasticky až na výjimku transportu xylémem. Symplastická dráha je regulována řadou transportérů, které spadají do skupin ZIP, CDF, NRAMP a HMA. ZIP transportéry se podílí převážně na přenosu iontů železa, zinku, manganu, niklu a kadmia. Většina zástupců CDF je lokalizována v tonoplastu a fungují jako antiporty, které přenáší ionty zinku, kadmia a niklu za protony. NRAMP proteiny transportů dvojvazné ionty kovů, ionty železnaté, manganaté, kademnaté, zinečnaté a taktéž byla prokázán transport nikelnatých iontů. Transportéry skupiny HMA jsou



Fytochelatin Glutathion

Obr. 4: Strukturní vzorec fytochelatinů syntetizovaných z redukovaného glutathionu (adaptováno ze Seth, 2011)

ATPasy, které se podílí na přenosu měďných, stříbrných, kademnatých, zinečnatých a olovnatých iontů. Většina těchto transportérů byla prozkoumána v modelových rostlinách *Arabidopsis thaliana* (Luo et al., 2016).

2.1.2 Fytovolatilizace

Sloučeniny těžkých kovů, například rtuti, nebo polokovů selenu a arsenu se mohou vyskytovat v plynné formě. Kovy a polokovy jsou přijímány apoplasticky i symplasticky v rhizosféře, xylémem dopraveny do listů, kde jsou metabolisovány a uvolněny do atmosféry. Využití této techniky k remediaci půd se nazývá fytovolatilizace (Padmavathiamma a Li, 2007).

Selen je metabolisován na dimethylselenid a jeho uvolňováním se proti toxickým účinků brání jak rostliny tak i živočichové, u kterých tento proces sledoval již v roce 1894 Hofmeister, který podával psům roztok telluridu sodného, který byl po metabolismu přítomen v jejich dechu, analogicky pak usoudil metabolickou dráhu pro nadbytek selenu v organismu. Zápach dimethylselenidu se podobá zápachu česneku, který je indikátorem probíhající volatilizace. Z fytoremediačních technik je tato velmi kontroverzní vzhledem k tomu, že nelze ovlivnit migraci uvolněných jedovatých látek rtuti a selenu, na druhou stranu poskytuje definitivní řešení remediace, které zbaví půdy kovů, a pouhé vysazení rostlin vede k dosažení cíle. Není nutné se zbavovat biomasy, je zajištěna nižší eroze půdy a minimální ovlivnění její funkce. (Padmavathiamma a Li, 2007).

Odstranění selenu může být zajištěno jak neakumulujícími rostlinami tak i jeho akumulátory s rozdílem v jaké sloučenině bude uvolněn. Akumulátory selenu převádějí jeho sloučeniny na methylselenocystein, který může být dále převeden na plynný dimethyldiselenid (Terry et al, 2000). Neakumulující rostliny vytváří dimethylselenid ze selenocysteinu (Wilber, 1980).

I v případě vysoce toxických solí rtuti přináší fytovolatilizace řešení. Rtuťnaté a rtuťné ionty jsou reduktasami redukovány ve volatilní elementární rtuť. Nicméně pro tento účel byly vytvořeny experimentální transgenní rostliny obsahující gen kódující bakteriální reduktasy merA a merB (Kotrba *et al.*, 2009).

Další z mála anorganických polutantů převeditelných do plynné formy je arsen. Vyšší rostliny nicméně nejsou schopny arsen metylovat, ale pouze redoxními reakcemi měnit

jeho oxidační stavy, například trimethylarsan oxid redukovat na volatilní trimethylarsan (Jia *et al*., 2012). Sakakakibara (*et al.*, 2007) věnoval pozornost kapradině *Pteris vittata*, která prokázala schopnost metabolisovat arsen na těkavé formy a i přes svůj nevelký vzrůst se prokázala jako účinná.

2.1.3 Fytostabilizace

Využití rostlin pro imobilizaci těžkých kovů a snížení jejich biologické dostupnosti se nazývá fytostabilizace. Pokrytí vegetací snižuje erozi půdy a tak i přesun polutantů do vodných roztoků a do vzduchu. Vzrůstající poměr neživé organické složky v půdě má za následek další snížení úniku znečišťujících složek. Působícími mechanismy jsou taktéž absorpce a akumulace v kořenech, adsorpce a precipitace v blízkém okolí kořenového systému. Pro tento účel jsou voleny rostliny, jejichž vnitřní procesy se aktivně podílí na transportu kovů ven z buněk, jelikož asimilace kovů v pletivech rostlin je v tomto případě nežádoucí. Tato metoda si neklade za cíl odstranění znečišťujících látek na rozdíl od ostatních fytoremediačních metod. Aplikace této metody je směřována do oblastí s rozsáhlou důlní těžbou, kde jsou půdy vysoce znečištěny těžkými kovy a nemají jiný zemědělský význam (Mendez a Maier, 2008).

2.1.4 Fytofiltrace

Pokud jsou předmětem zájmu odpadní vody a jejich remediace existuje technika zvaná fytofiltrace, která je rozdělena na blastofiltraci a rhizofiltraci. Blastofiltrace využívá vodních rostlin. Pro rhizofiltraci se používají rostliny terestrální, které byly předem vypěstovány hydroponicky a následně vsazeny do odpadních vod. Mechanismy podílející se na dekontaminaci jsou biosorbce, chemisorbce, adsorbce, tvorby komplexů a taktéž precipitace díky změnám pH, které nastávají v okolí rhizosféry. Terestrální rostliny jsou účinější než rostliny vodní. Vodu filtrují svým rozvětveným vláknitým kořenovým systémem, jehož povrch je velmi výrazně zvětšen kořenovým vlášením. Obrovský povrch je tak výhodný pro precipitaci rozpuštěných iontů kovů (Padmavathiamma a Li, 2007).

Prasad a Freitas (2003) vidí v rhizofiltraci výhodu, že je veřejností vnímána pozitivně, nicméně ji taktéž vnímají jako metodu s největší šancí neúspěchu v porovnání s metodami, které jsou stejně nákladné. Problém vidí zejména v udržení produkce

hydroponicky pěstovaných rostlin pro filtraci velkých ploch, která vyžaduje odborný personál, zařízení a vybavení, což může vést ke zvýšení nákladů.

2.2 Konopí seté

Konopí seté (lat. *Cannabis sativa*) patří mezi první pěstované plodiny, které jsou člověku známé. Původem je z východní Asie a zmínky o ní sahají do doby 4000 př. n. l. Pěstováno bylo pro svá vlákna, ze kterých byla vyráběna lana, textil i papír, a ještě před rozmachem křesťanů, kteří přinesli nové plodiny, sloužilo také jako potravina. Ze starověké Číny existují důkazy o tom, že bylo konopí taktéž využíváno jako léčivo, drogou byly plody, listy i kořeny. Zavlečení do ostatních světadílů se rostlina dočkala o mnoho století později. V čase její účel jako potravina a jako léčivo upadal, ale stále zůstává pěstována pro pevná vlákna (Li, 1974).

Konopí je jednoletá rostlina vyrůstající ze semen. Klíčení trvá tři dny až týden, růst rostliny a tvorba biomasy je rapidní, a to zejména do dostatku velkého množství slunečního záření. Tyto rostliny jsou náročné na velké množství živin a vody, ve výsledku mohou dorůst výšky až pěti metrů. Prodlužování noci po letním slunovratu vede k nasazování květů a ukončování životního cyklu. Typicky bývají dvoudomé, ale mohou se vyskytovat i jednodomé varianty. Samčí a samičí rostliny jsou nerozlišitelné do doby dokud nedojde k nasazení květů. Konopná semena jsou vydatným zdrojem lipidů s vyváženým zastoupením esenciálních mastných kyselin (Grotenhermen a Russo, 2002).

Taxonomicky v současné době konopí spadá do rodu *Cannabis*, který je poměrně izolovaným, je si příbuzný například s rodem *Humulus*, jehož zástupcem je chmel otáčivý. Spolu tyto rody spadají pod čeleď konopovitých (*Cannabaceae*) jíž je nadřazen řád růžotvarých (*Rosales*) (Jahodář, 2012). Nicméně klasifikace se může lišit u různých autorů. Takhtajan (2009) stále řadí konopovité do řádu *Urticales*. S příchodem fylogenetiky došlo však ke změnám v klasifikaci do podoby jakou známe dnes (Systma et al., 2002).

Vnitřní taxonomické členění rodu *Cannabis* je poměrně komplikované, jelikož řada autorů se přidružuje k různým názvům. Small (2015) uvádí několik skupin konopí s klasifikací Smalla a dalších autorů. První skupinou jsou odrůdy vycházející z Evropy a západní Asie, které jsou účelně pěstovány pro vlákno, obsah THC nízký a CBD

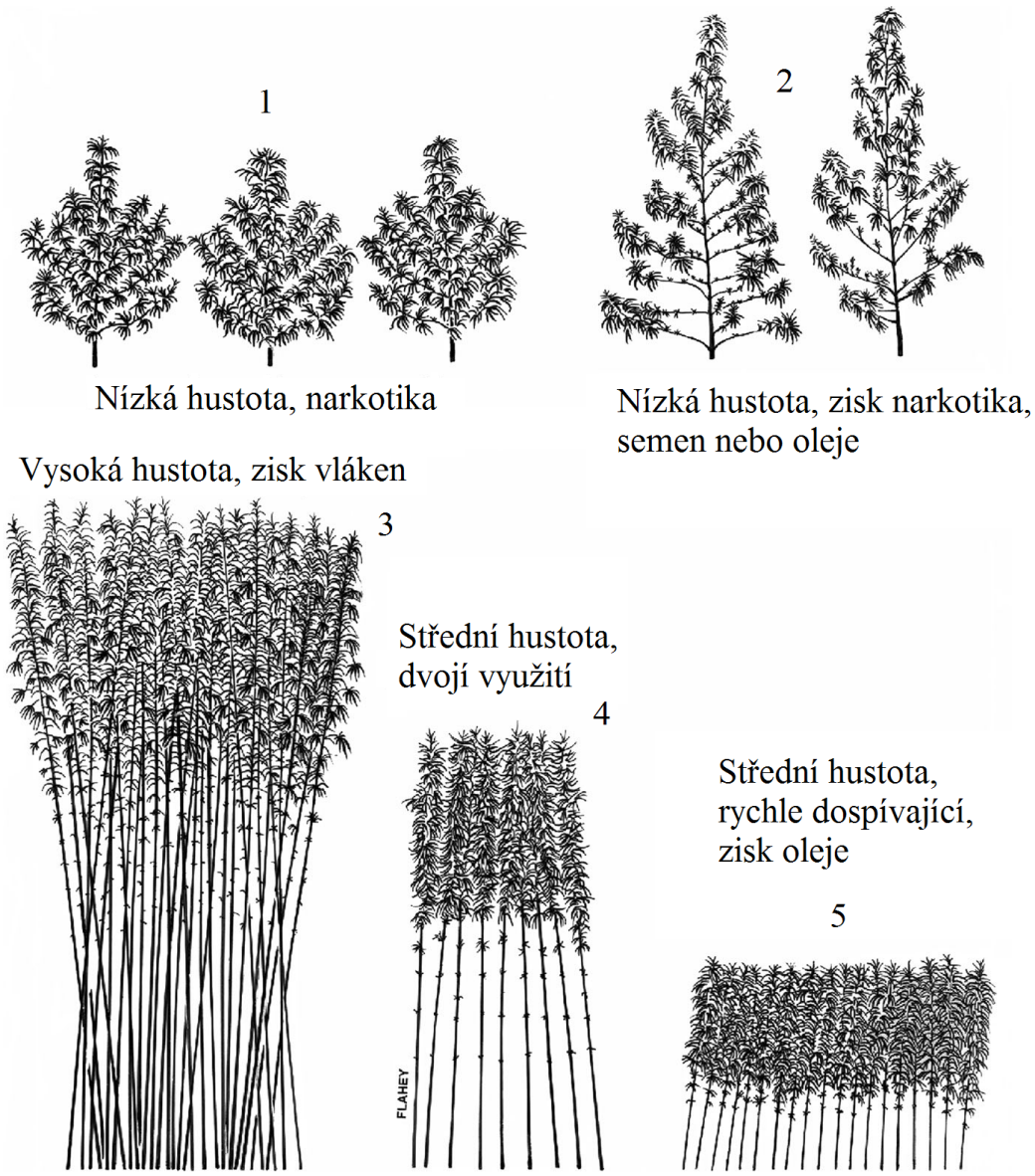
vysoký (více o THC a CBD v kap.2.2.2 Medicinální užití), Small je označuje jako *C. sativa* podd. *sativa* a Hillig jako *C. sativa*. Druhou skupinou odrůd pocházející z východní Asie pěstovaných pro vlákno, které mají nízký až střední obsah THC a vysoký CBD, Small označuje jako *C. sativa* podd. *sativa*, Hillig jako *C. indica*. Třetí skupinou jsou konopné odrůdy pocházející široké oblasti centrální Asie pěstované pouze pro narkotické účinky s obsahem výhradě THC, Small je označuje jako *C. sativa* podd. *indica*, Hillig jako *C. indica*. Poslední skupinou jsou odrůdy pocházející z oblasti Afgánistánu, které jsou pěstovány pro narkotické účinky a mají jak vysoký obsah THC tak i CBD, Small a Hillig zanechávají stejné označení jako u třetí skupiny, Clarke a Merlin jej označují jako *C. indica* podd. *afganica*. Právě šlechtěním z prvním dvou skupin vychází odrůdy, které se řadí do technického konopí. Morfologie různých odrůd uvedena v obr. 5.

2.2.1 Technické konopí

Pojem technické konopí se odkazuje na odrůdy, které nejsou pěstovány pro narkotické účely, ale pouze pro průmyslové, technické a zahradnické účely. Pěstování těchto odrůd je spjato s legislativou a pěstovat lze pouze licencované, jejichž obsah THC je nižší než 0,3% (Small, 2015). Tento obsah je vztažený na vzorek, který byl vysušen a zbaven tvrdých částí jako stonek a semena. Koncem roku 2016 bylo Celní správou České republiky registrováno 55 povolených odrůd technického konopí.

2.2.2 Medicinální využití

Konopí bylo po staletí užíváno jako terapeutická plodina. V Evropě 19. století bylo aplikováno na léčbu křečí, bolestí, astmatu, poruchy spánku, depresi a ztrátu chuti. V 20. století zaznamenalo úpadek, který byl ale zvrácen objasněním struktury THC (obr. 6), aktivní složky, v roce 1964 (Gaoni a Mechoulam, 1964). Do dnes byly identifikovány dva receptory kanabinoidů CB_1 a CB_2. Receptory CB_1 byly nalezeny nejen v CNS, ale i v periferních tkáních a orgánech, buňkách imunitního systému, slinivky, srdce, kůže, cévách, plicích, v částech urogenitálního a gastrointestálního traktu. Receptor CB_2 je lokalizován převedším v periferních tkáních, zejména buňkách imunitního systému. Aktivace CB_1 receptoru vede k inhibici uvolnění řady neutransmiterů, čož vede k řadě fyziologických účinků. Mimo nejúčinější složku THC spouští reakce i další látky, kupříkladu CBD (obr. 6), pro který byly prokázany



Obr. 5: Běžné morfologie vyšlechtěných odrůd konopí (převzato a upraveno ze Small, 2015). 1 reprezentuje odrůdy nízkého vzrůstu pěstované v nízké hustotě, účelně pěstovány pro narkotika. 2 reprezentuje odrůdy pěstovány též v nízké hustotě, účelně pěstovány pro narkotika, olej nebo semena pro sadbu. 3 reprezentuje odrůdy výhradně pěstované pro vlákna stonků, rostliny jsou vysévány ve vysoké hustotě. 5 reprezentují odrůdy nízkého vzrůstu s krátkou vegetační dobou, které jsou cíleně pěstovány pro olej. 4 reprezentuje odrůdy, které jsou pěstovány pro vlákno i pro olej. Číslování nekoresponduje s označením skupin odrůd v textu.

antiemetické, neuroprotektivní a antiflogistické účinky. Mimo tyto účinky konopné produkty působí taktéž antispasticky a analgeticky (Grotenhermen a Müller-Vahl, 2012).

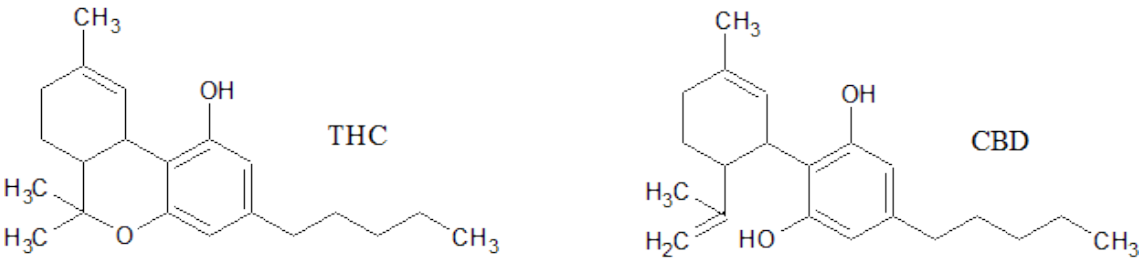
Kanabinoidy jsou skupinou terpenofenolických sekundárních metabolitů. Jen část jich má psychoaktivní účinky jako již výše zmíněné THC, CBD. Společným znakem

je skelet čítající 21 uhlíkových atomů a 22 v případě karboxylované formy. Poměry mezi těmito dvěma látkami indikují o jakou odrůdu konopí se jedná. Nízké koncentrace CBD a vysoké koncentrace THC se vyskytují o odrůd vyšlechtěných pro narkotické účinky, vysoké koncentrace CDB a nízké koncentrace THC jsou pak typické pro technické odrůdy. Kvalita medicinálních preparátů obsahující vyšší množství THC je ovlivněna přítomností kyslíku, vysokými teplotami, světlem a vlhkostí, dochází tak k degradaci. Množství kanabinoidů se v průběhu života rostliny mění a koncentrace vzrůstají se stářím rostliny. Nejméně je jich obsaženo ve stoncích a starých listech, nejvíce potom v mladých listech a v květech. Pro výrobu medicinálních preparátů je důležitý obsah THC, ale i CBD, které modifikuje účinky hlavní terapeutické látky. Zlepšení účinků spočívá ve snížení psychotického účinku a nedostavují se možné pocity úzkosti, které jsou spjaty s užíváním velkých dávek THC (Small, 2015).

2.2.3 Potenciál konopí ve fytoremediaci

Pandey *et al*. (2015) řadí mezi hlavní kandidáty pro fytoremediaci rody *Ricinus*, *Jatropha*, *Miscanthus* a *Populus*. Nevynechává však rod *Cannabis*. Práce Shi a Cai (2009, 2010) potvrdila schopnost konopí odolávat vysokým koncentracím kadmia i zinku, byla prokázána malá inhibice růstu a fotosyntetické aktivity v porovnání s ostatními rostlinami. Vyprodukovaná biomasa na kadmiem a zinkem znečištěných plochách potom může sloužit pro produkci bionafty. Ahmad et al. (2016) se věnovali identifikaci genů, které se podílely na toleranci. Byla zjištěna velká míra exprese glutathiondisulfidreduktasy a fosfolipasy D-α.

Linger *et al.* (2002) přistoupili při posouzení potenciálu konopí v dekontaminaci k sledování dalšího využití této plodiny. Na kontaminovanou plodinu už nelze pohlížet jako na potravinu, nicméně užití konopných vláken z těchto rostlin není ohrožující.



Obr. 6: Strukturní vzorce dvou významných kanabinoidů THC a CBD (Převzato a upraveno ze Small, 2015).

Srovnání s běžně pěstovanými rostlinami ukázalo, že kvalita konopného vlákna není těžkými kovy ovlivněna, produkce je však nižší.

2.2.4 Legislativa

Zákon o návykových látkách v plném znění Zákon č. 362/2004 Sb., kterým se mění zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a zákon č. 2/1969 Sb., o zřízení ministerstev a jiných ústředních orgánů státní správy České republiky, ve znění pozdějších předpisů umožňuje pěstování konopí, nicméně je doprovázeno omezujícími právními úkony.

Dle § 29 je pěstování konopí na ploše větší než 100 m^2 doprovázeno ohlašovací povinností příslušnému celnímu úřadu. V ohlášení je nutné uvést například výměru pozemku, název registrované odrůdy, způsob zneškodnění konopí ještě před jeho sklizením. Do konce kalendářního roku pak údaje o množství sklizeného konopí a konopného semena.

V § 36 je uvedeno pěstování odrůd konopí, které mohou obsahovat více jak 0,3 % látek ze skupiny tetrahydrokanabinolů, jako správní delikt, za který může být udělena pokuta podle § 37.

Vyhláška 236/2015 Sb. věnována konopí pro lékařské účely stanovuje podmínky přípravy, značení, distribuce i předepisování. Taktéž stanovuje hranice pro obsah THC, CBD a kontaminujících látek.

2.3 Metody stanovení těžkých kovů

Vývoj analýzy kovů v rostlinných materiál vede k pochopení úloh a aktivity kovů v rostlinách. Dokonalejší metody a zpracování umožňují pozorování molekul vázaných s kovy. Jedná se o koordinační komplexy fytochelatinů, metalothioneinů a jiných látek, které hrají roli při udržování homeostázy, transportu kovů a jejich uskladnění. Klasickou metodu jednoprvkové analýzy AAS postupně nahrazuje metoda ICP-MS (Husted *et al.*, 2011).

2.3.1 Atomová absorpční spektrometrie

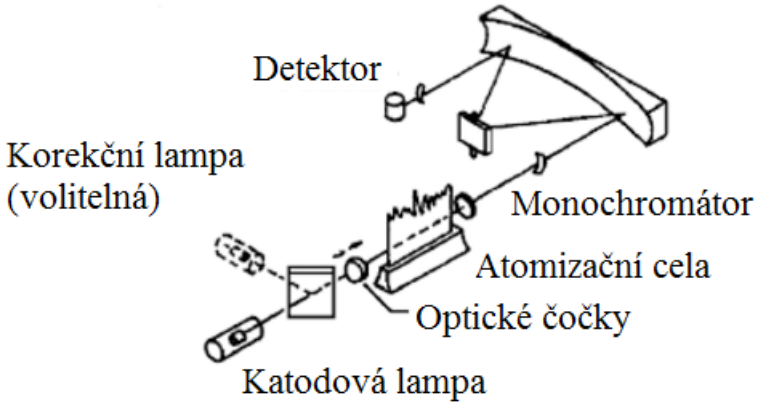
Atomová absorpční spektrometrie se stala jednou z často používaných metod ke stanovení většiny kovů a polokovů ve vzorcích. Stalo se tak díky dostačující citlivosti ve většině aplikací a taktéž díky málo interferencím, ke kterým dochází.

Existují dva základní přístupy pro tuto metodu. Prvním z nich je plamenová AAS a druhá elektrotermická AAS. Plamenová varianta umožňuje při měření několika prvků rychlou analýzu, nicméně do přesnosti a limitou detekce zaostává za elektrotermickou (Hill a Fisher, 2017).

Ve svém principu je AAS postavena na interakci atomizovaných částic s elektromagnetickým zářením. Konkrétně je stanovován úbytek světelného záření a charakteristických vlnových délkách. Světelný paprsek procházející vzorkem excituje elektrony atomů, tím dojde k jeho absorpci, která je přímo úměrná koncentraci vzorku. Pro každý prvek existuje série charakteristických vlnových délek odpovídajících energetickým přechodům elektronů (Gilmutdinov, 2017).

Atomová absorpční spektrometrie je Evropským výborem pro normalizaci stanovena jako jediná metoda pro stanovení těžkých těžkých kovů v potravinách. Pro každý prvek je stanoven normovaný postup a konkrétní metoda.

Instrumentální zařízení je sestaveno ze tří hlavních úseků, a to zdroje záření, cely, ve které dochází k atomizaci vzorku, a detektoru. Zdroj záření je zajištěn dutou katodovou výbojkou, která zajišťuje světelný tok o úzkém pásu vlnových délek bez výrazného pozadí. Korekce pozadí záření je zajištěna korekčními systémy v blízkosti lampy. Výběr specifických vlnových délek zajišťuje monochromátor. Způsob atomizace odráží název metody. V plamenové AAS (obr. 7) je vzorek zmlžen v rychle proudícím plynu a následně atomizován v plamenu. Pro většinu aplikací je využívána směs acetylenu a vzduchu, ve speciálních případech je využívána směs acetylenu a oxidu dusného. Paprsek procházející plamenem hořáku je dopadá na detektor. Signál je amplifikován fotonásobičem a vyhodnocen. V případě elektrotermická AAS je trubice z grafitu vyhřívána elektrickým proudem. Vzorek nanesený na trubici je vysušen a po atomizaci opouští stěny a ionty padají do světelného proudu (Hill a Fisher, 2017).



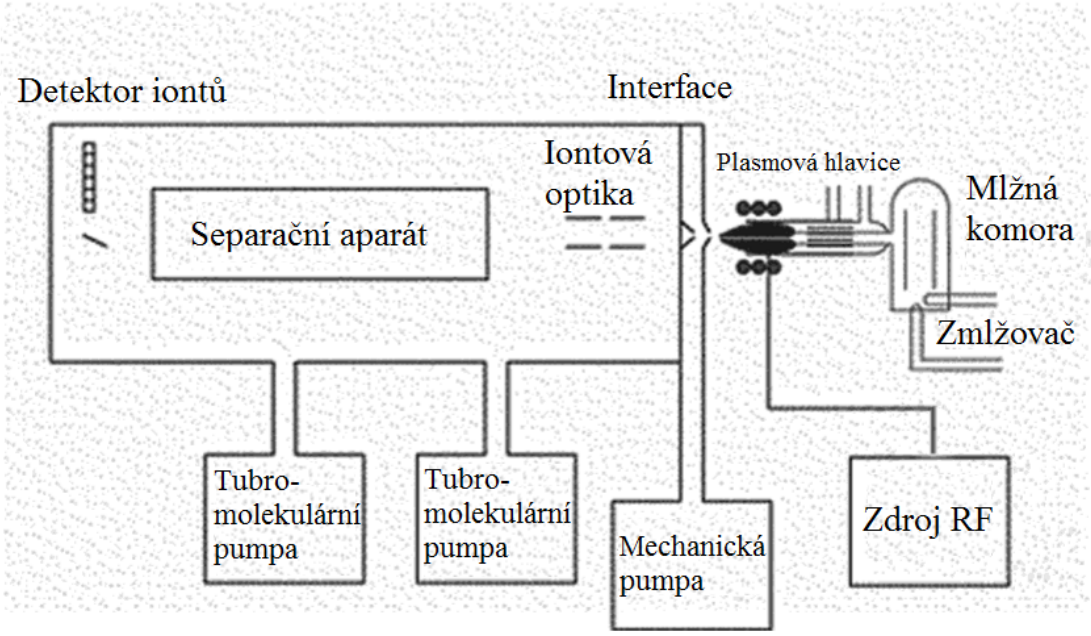
Obr. 7: Schéma jednopaprskové AAS. Naznačená korekční lampa je jeden z možných způsobů korekce pozadí záření. Atomizační cela v tomto případě je složena z hořáku a k atomizaci dochází v plameni (převzato a upraveno z Hill a Fisher, 2017).

2.3.2 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, zkráceně ICP-MS, je metodou, která se stala komerčně dostupná v roce 1983. Od této doby zůstává velmi univerzální metodou pro stanovení stopových množství prvků. V praxi nemá konkurenční metodu, která operuje podobnou rychlostí a rozsahem linearity. Poskytuje multiprvková stanovení a to až v koncentracích $ng \cdot dm^{-3}$ (Thomas, 2007).

Existuje několik designů (jeden uvedený v obr. 8), ale řada komponentů přístroje je společná. Vzorek je nasáván peristaltickou pumpou a veden do zmlžovače s mlžnou komorou, kde je převeden do jemného aerosolu, který je následně smíchán s plynným argonem. V mlžné komoře dojde k oddělení jemných a větších kapek aerosolu. Jemné kapky spolu s argonem putují do plazmové hlavice. Plazma je formována interakcí silného magnetického pole vytvářeného indukční měděnou cívkou a tangenciálního směru toku argonu s aerosolem. Tímto dochází k ionizaci plynu, který formuje plazmu při styku s elektrickou jiskrou o vysokém napětí. Následuje část hmotnostního spektrometru, kam je plazma hnána přes interface, který se skládá z dvojice konusů, a iontovou optiku, přes kvadrupól až na detektor. Interface zajišťuje separaci iontů

od zbytku plazmy, konusy mají malý průměr čímž dojde k redukci, mezi oběma konusy je tzv. expanzní komora, ve které je podtlak zprostředkovaný pumpami. Podtlak má za následek zrychlení proudu a ochlazení plazmy. Iontová optika v zařízení usměrňuje proud iontů ve směru detektoru, zároveň zabraňuje tomu, aby na detektor dopadaly fotony a neutrální částice. Kvadrupól v ICP-MS pracuje jako filtr částic a separuje je v závislosti *m/z*. Přístroje obsahující kvadrupól jako separační složku jsou zpravidla vybaveny kolizní celou, která zajišťuje eliminaci polyatomických spektrálních interferencí. K této eliminaci dochází, tak že do cely je vháněn kolizní plyn, který rozbíjí vzniklé polyatomické adukty. Po dopadu na detektor je signál znásoben elektronovým násobičem (Thomas, 2007).



Obr. 8: Schéma instrumentálního zařízení ICP-MS. Zdroj RF je vysokofrekvenčním generátorem sloužící jako zdroj energie pro plasmu. Mechanická pumpa zajišťuje nízký tlak pro expanzi plynu v interface. Turbomolekulární pumpy udržují velmi vysoké vakuum. Separační aparát propouští ionty na detektor v závislosti m/z (převzato a upraveno z Thomas, 2007).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 As v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Cd v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Co v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Cr v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Cu v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Fe v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Hg v 5% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Mn v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Ni v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Pb v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

CRM vodného kalibračního roztoku, 1000 ± 2 mg/dm^3 Zn v 2% HNO_3 (v/v), (Analytika, Česká republika)

Kyselina dusičná, čistota Analpure® (Analytika, Česká republika)

Peroxid vodíku, čistota p.a.+ (Analytika, Česká republika)

Dusičnan kademnatý tetrahydrát (Penta, Česká republika)

Dusičnan olovnatý (Lach-Ner, Česká republika)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Dusičnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Dusičnan amonný (Lach-Ner, Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Síran hořečnatý heptahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina trihydrogenboritá (Lach-Ner, Česká republika)

Síran měďnatý pentahydrát (Penta, Česká republika)

Chlorid kobaltnatý hexahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Síran zinečnatý heptahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid manganatý dihydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Molybdenan amonný tetrahydrát (Sigma-Aldrich, Spojené státy americké)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina etylendiamintetraoctová (Lach-Ner, Česká republika)

Síran železnatý heptahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

MES pufr (2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina), (Sigma-Aldrich, Spojené státy americké)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Matricový referenční materiál pro kontrolu jakosti METRANAL 3 Jahodové listí (Analytika, Česká republika)

Matricový referenční materiál pro kontrolu jakosti METRANAL 8 Zelená řasa (Analytika, Česká republika)

Cetrifikovaný referenční materiál vodný roztok fortifikovaný stopovými prvky TM 15.2 (Environment Canada, Kanada)

Certifikovaný referenční materiál vodný roztok fortifikovaný stopovými prvky TM 64.2 (Environment Canada, Kanada)

Tuning Solution pro ICP-MS (Agilent Technologies, Japonsko)

Interní standard pro ICP-MS (Agilent Technologies, Japonsko)

Redestilovaná voda (Milli-Q)

3.1.1.1 Biologický materiál

Pro experiment byly zvoleny dvě odrůdy technického konopí, a to Bialobrzeskie a Monoica, semínka poskytla firma AGRITEC, s.r.o.

Stanovení obsahu vybraných těžkých kovů bylo provedeno u vzorků poskytnuté firmou HEMPOINT s.r.o. Vzorky byly v různých formách – květy, prachová forma, lisované pelety.

3.1.2 Přístrojové vybavení a pomůcky

Autokláv (Tuttnauer, Slovensko)

Magnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)

Mikrovlnný mineralizátor MLS 1200 mega (Milestone, Spojené státy americké)

Analytické váhy MS 205 DUIM (Mettler-Toledo, Spojené státy americké)

Systém pro přípravu ultračisté vody Milli-Q (Merck Millipore, Spojené státy americké)

Analytické váhy Adventurer™ Pro (OHAUS, Spojené státy americké)
Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko)
ICP-MS spektrometr (Agilent Technologies, Japonsko)
pH metr CX-505 (Elmetron, Polsko)
Automatické pipety 100 – 5000 ml (Eppendorf, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace rostlin

Semena konopí byla sterilizována nejprve v 1% roztoku chlornanu sodného a následně v 60% roztoku ethanolu. Následně byla vsazena do perlitu, před vyklíčením zalita vodou, po vyklíčení byly rostliny kultivovány ve fytotronu a zalévány nutričním roztokem podle Hoaglanda (Hoagland a Arnon, 1950). Stanovená teplota byla 25 °C, vlhkost 60 % a intenzita osvětlení 600 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, světelná fáze trvala 16 h.

Po uběhnutí doby tří týdnů byly rostliny zality 200 ml roztoku těžkých kovů, kontrolní skupina roslin vodou. V roztoku těžkých kovů byly ponechány rostliny po dobu jednoho týdne.

3.2.2 Příprava kultivačních roztoků

3.2.2.1 Kultivační roztok podle Hoaglanda

Hoaglandův nutriční roztok byl připraven smícháním zásobních roztoků ve stanoveném poměru. Zásobní roztoky byly autoklávovány a uschovány v lednici. Do objemu 10 dm^3 výsledného roztoku bylo přidáno 2,5 g MES pufru a pH bylo upraveno pomocí hydroxidu draselného na hodnotu 6,00. Složení zásobních roztoků a objemy pro přípravu hotového roztoku jsou uvedeny v tab. 1.

3.2.2.2 Roztok těžkých kovů

Do ošetřujícího roztoku byly zvoleny kovy kadmium a olovo. Zvolené koncentrace činily 100 $mg \cdot kg^{-1}$ pro ionty olova a 50 $mg \cdot kg^{-1}$ pro ionty kadmia. Navážky pro přípravu jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 1: Zásobní roztoky Hoaglandova nutričního roztoku a objemy zásobních roztoků, které slouží k vytvoření 10 dm^3 finálního roztoku

Roztok	Složení	Navážka [$g \cdot dm^{-3}$]	Koncentrace zásobního roztoku [$mol \cdot dm^{-3}$]	Objem pro finální nutriční roztok [$cm^3 \cdot dm^{-3}$]
1	$Ca(NO)_3 \cdot 4H_2O$	236,2	1,00	4
2	KNO_3	101,1	1,00	4
3	NH_4NO_3	40,0	0,50	2
4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	61,6	0,25	4
5	KH_2PO_4	34,0	0,25	2
6	KCl	18,6	0,25	0,4
7	H_3BO_3	3,092	0,05	1
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,792	0,004	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,150	0,004	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,250	0,001	
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,072	0,0003	
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,186	0,00015	

3.2.2.3 Příprava roztoku Fe(EDTA)

Zásobní roztok chelatovaných železnatých iontů byl vytvořen smícháním dvou roztoků. Celkový objem zásobního roztoku činil 500 cm^3. První roztok byl vytvořen rozpuštěním 12,45 g heptahydrátu síranu železnatého v roztoku kyseliny chlorovodíkové. Ten byl vytvořen přidáním 177 mm^3 35% kyseliny chlorovodíkové do 150 cm^3 destilované vody. Druhý roztok byl vytvořen rozpuštěním 16,65 g kyseliny etylendiamintetractové a 2,008 g hydroxidu sodného v 250 cm^3 destilované vody. Po smíchání byl roztok autoklávován a následně doplněn do objemu 500 cm^3. 0,8 cm^3 je objem zásobního roztoku, který slouží k vytvořený 1 dm^3 finálního roztoku.

Tab. 2: Navážky solí těžkých kovů pro ošetřující roztok

Složka	Objem [cm^3]	Koncentrace [$mg \cdot dm^{-3}$]	Navážka [mg]
$Pb(NO_3)_2$	2400	100	383,6
$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$		50	329,3

3.2.3 Zpracování rostlinného materiálu

Čtyřtýdenní rostliny byly sklizeny, kořeny zbaveny perlitu a rozděleny na orgány, stonek, kořen a listy. Následně byly vysušeny do konstantní hmotnosti, rozmělněny v třecí misce a uchovány v uzavíratelných plastových sáčcích.

Vzorky konopí dodané firmou Hempoint homogenizovány nebyly a byly mineralizovány přímo. Každý vzorek byl mineralizován a analyzován ve třech replikách.

Vzorky byly naváženy do mineralizačních teflonových kelímků, k navážce byla přidána rozkladná směs, 2 ml 60% kyseliny dusičné (Analpure) a 1 ml 30% peroxidu vodíku (p.a.+). Takto připravené vzorky byly přivedeny na vysokou teplotu mikrovlnným mineralizátorem. Program mineralizátoru je uveden v tab. 3. Dodané množství energie je vysoké pro zajištění úplného rozkladu vzorků. V každém mineralizačním cyklu byl zahrnut slepý vzorek nebo referenční materiál pro kontrolu správnosti zpracování a laboratorní činnosti. Slepý vzorek byl tvořen pouze rozkladnou směsí v teflonovém kelímku.

3.2.4 Příprava kalibrační řady

Pro prvkovou analýzu byly sestaveny kalibrační řady pro 11 prvků. Koncentrace jednotlivých bodů řady byly 10 $mg \cdot kg^{-1}$, 1 $mg \cdot kg^{-1}$, 100 $\mu g \cdot kg^{-1}$, 50 $\mu g \cdot kg^{-1}$, 10 $\mu g \cdot kg^{-1}$ a 1 $\mu g \cdot kg^{-1}$. Základní roztok byl připraven pipetováním 250 µl vodného roztoku CRM (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb a Zn) do odměrné baňky a doplněním do objemu 25 ml, zbylé body kalibrační řady byly připraveny ředěním 2,5 ml koncentrovanějšího roztoku do odměrné baňky o objemu 25 ml.

Tab. 3: Zvolený program mineralizátoru. Jeden rozkladný proces zahrnuje šest vzorků.

Čas [min]	Výkon [W]
2	250
2	0
5	400
2	0
2	500
2	0
6	600
5	ventilace

3.2.5 Prvková analýza

Prvková analýza byla provedena na přístroji ICP-MS. Analýza vzorků a referenčního materiálu na probíhala ve dvou modech, první byl bez přídavku kolizního plynu a druhý s přídavkem helia. Přídavek helia eliminoval interferující adukty argonu.

Samotné analýze předchází procesy promytí a interní kalibrace zařízení. K promývání byl použit slabý roztok kyseliny dusičné. Jeden z úkonů interní kalibrace vyžaduje Tuning Solution dodávaný výrobcem. Při měření je kontinuálně spotřebováván interní standard dodávaný výrobcem, kterým je neustále kontrolována činnost zařízení. Interní standard obsahuje čtyři prvky, jejichž obsah není často stanovován, a to skandium, germanium, indium a bismut. Zařízení provádí automatické korekce na interní standard.

3.2.6 Vyhodnocení

Matematické zpracování naměřených dat bylo provedeno v programu LibreOffice Calc. Ke kresbě strukturních vzorců byl použit program ChemSketch.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení vybraných kovů v konopí

Jedním z cílů práce bylo stanovit obsah těžkých kovů ve vzorcích konopí setého. Pro tento cíl byly analyzovány vzorky dodané firmou Hempoint. Sledován byl obsah arsenu, kadmia, kobaltu, chromu, mědi, rtuti, železa, manganu, niklu, olova a zinku. Nařízení komise (EH) č. 1881/2006 stanovuje maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Ze sledovaných kovů jsou limity stanovené pro kadmium, olovo a rtuť. Horní hranice pro obsah kadmia (tab. 4) v doplňcích stravy je 1,0 $mg \cdot kg^{-1}$, který z žádných vzorků nepřekročil. Hraniční obsah olova (tab. 4) v doplňcích stravy činí 3,0 $mg \cdot kg^{-1}$. Oba vzorky převedené do prachové formy se této hranici přibližují, nicméně k jejich překročení nedošlo ani v rozsahu směrodatné odchylky. Limity pro obsah rtuti (tab. 5) jsou převážně stanoveny pro potraviny, které nejsou rostlinného původu. Doplňky stravy však mohou obsahovat maximálně 0,1 $mg \cdot kg^{-1}$. U většiny vzorků přítomnost rtuti nebyla detekována nebo minimální množství, které se limitu nepřibližuje. Nařízení komise (EH) 2015/1006 nově stanovuje obsah arsenu (tab. 5) v potravinách, nicméně je stanoven pro výrobky z rýže a není uvedena limita ani pro doplňky stravy. Pro ostatní stanovené kovy (tab. 6,7,8) legislativa Evropské unie nedefinuje limity.

Tab. 4: Stanovené koncentrace kadmia a olova ve vzorcích konopí. V závorkách uvedeny směrodatné odchylky (n=3).

	Koncentrace kadmia [$\mu g \cdot kg^{-1}$]	Koncentrace olova [$\mu g \cdot kg^{-1}$]
Tisza (prach) BIO	118,4 (4,7)	2613,8 (216,0)
Fedora (tříděná)	109,1 (0,7)	1033,4 (24,4)
Tiborszalasi BIO	29,0 (2,3)	341,4 (21,5)
Finola (tříděná) BIO	119,8 (10,9)	825,9 (25,0)
Ferimon (prach) BIO	65,1 (1,1)	2796,3 (134,1)
Tiborszalasi (tříděná) BIO	9,0 (0,7)	376,1 (18,2)
Tisza (tříděná) BIO	40,5 (1,9)	789,8 (27,1)
Fedora BIO	55,6 (3,7)	1404,7 (29,9)
Tisza (pelety tříděné) BIO	34,2 (1,5)	623,9 (21,4)
Tiborszalasi (pelety tříděné) BIO	39,6 (3,0)	555,5 (17,0)
Kompolti (tříděná) BIO	22,8 (1,7)	908,0 (77,5)

Tab. 5: Stanovené koncentrace arsenu a rtuti ve vzorcích konopí. V závorkách uvedeny směrodatné odchylky (n=3).

	Koncentrace arsenu [$\mu g \cdot kg^{-1}$]	Koncentrace rtuti [$\mu g \cdot kg^{-1}$]
Tisza (prach) BIO	211,1 (14,6)	<LOD
Fedora (tříděná)	<LOD	<LOD
Tiborszalasi BIO	<LOD	<LOD
Finola (tříděná) BIO	<LOD	<LOD
Ferimon (prach) BIO	706,4 (51,7)	<LOD
Tiborszalasi (tříděná) BIO	37,1 (1,4)	<LOD
Tisza (tříděná) BIO	99,9 (9,0)	<LOD
Fedora BIO	222,3 (21,8)	18,0 (9,1)
Tisza (pelety tříděné) BIO	104,7 (5,1)	7,7 (2,7)
Tiborszalasi (pelety tříděné) BIO	108,5 (7,0)	2,4 (1,8)
Kompolti (tříděná) BIO	113,4 (7,1)	15,1 (3,9)

Vyhláška 236/2015 Sb. stanovuje maximální obsah těžkých kovů v konopí pro léčebné účely, který činí 5,0 $mg \cdot kg^{-1}$ pro olovo, 1,0 $mg \cdot kg^{-1}$ pro kadmium a 0,1 $mg \cdot kg^{-1}$ pro rtuť. Tyto požadavky vzorky splňují.

Množství zinku a mědi (tab. 6) dosahuje řádově stejných hodnot napříč všemi vzorky. Obsah železa (tab. 7) je výrazně vyšší u vzorků převedených do formy prachu. Zvýšené množství je pravděpodobně způsobeno mechanickým zpracováním vzorků. Tato skutečnost by však musela být ověřena novým experimentem. Stejný trend lze pozorovat i u koncentrací chromu (tab. 8). Množství manganu (tab. 7) i kobaltu (tab. 8), mikronutrientů, je odlišné na úrovní řádů napříč všemi vzorky.

Tab. 6: Stanovené koncentrace zinku a mědi ve vzorcích konopí. V závorkách uvedeny směrodatné odchylky (n=3).

	Koncentrace zinku [$mg \cdot kg^{-1}$]	Koncentrace mědi [$mg \cdot kg^{-1}$]
Tisza (prach) BIO	44,8 (2,3)	11,3 (0,1)
Fedora (tříděná)	53,3 (3,2)	18,8 (0,4)
Tiborszalasi BIO	50,8 (3,8)	12,4 (1,1)
Finola (tříděná) BIO	64,4 (0,9)	12,6 (0,6)
Ferimon (prach) BIO	59,7 (5,0)	16,4 (1,1)
Tiborszalasi (tříděná) BIO	57,8 (1,4)	12,2 (0,2)
Tisza (tříděná) BIO	44,9 (0,4)	8,7 (0,4)
Fedora BIO	66,1 (2,1)	16,0 (0,7)
Tisza (pelety tříděné) BIO	44,2 (1,5)	10,6 (0,3)
Tiborszalasi (pelety tříděné) BIO	59,8 (2,8)	11,2 (0,5)
Kompolti (tříděná) BIO	51,1 (4,8)	11,3 (1,0)

Tab. 7: Stanovené koncentrace železa a manganu ve vzorcích konopí. V závorkách uvedeny směrodatné odchylky (n=3).

	Koncentrace železa [mg·kg^{-1}]	Koncentrace manganu [mg·kg^{-1}]
Tisza (prach) BIO	1242,3 (112,4)	491,6 (19,6)
Fedora (tříděná)	528,7 (29,7)	256,4 (5,1)
Tiborszalasi BIO	140,8 (11,5)	105,8 (6,5)
Finola (tříděná) BIO	402,1 (12,5)	507,3 (18,4)
Ferimon (prach) BIO	1186,3 (53,5)	319,3 (16,1)
Tiborszalasi (tříděná) BIO	154,5 (7,6)	127,5 (9,7)
Tisza (tříděná) BIO	204,3 (10,4)	107,3 (9,0)
Fedora BIO	704,7 (52,8)	196,8 (12,8)
Tisza (pelety tříděné) BIO	223,9 (17,4)	94,0 (2,3)
Tiborszalasi (pelety tříděné) BIO	461,5 (30,1)	101,6 (2,7)
Kompolti (tříděná) BIO	323,1 (16,8)	93,1 (4,2)

4.2 Vyhodnocení růstu rostlin

Druhou částí experimentální části bylo porovnání fytoremediačních schopností dvou odrůd technického konopí. Po 21 dnech byl pozorovatelný rozdíl mezi velikostí rostlin odrůdy Bialobrzeskie, která vyprodukovala více biomasy oproti odrůdě Monoica. Ošetření rostlin roztokem těžkých kovů nevedlo k výraznému potlačení růstu, což dokazuje schopnost konopí tolerovat vysoké koncentrace toxických kovů. Až po pěti dnech se objevily první nekrotické skvrny na listech, spodní listy začaly odpadávat. I přes uniformní rozměry prýtů byly rozměry kořenových systémů odlišné. Parametry kultivovaných rostlin zaznamenány v tab. 9.

Tab. 8: Stanovené koncentrace niklu, kobaltu a chromu v dodaných vzorcích konopí. V závorkách uvedeny směrodatné odchylky (n=3).

	Koncentrace niklu [µg·kg^{-1}]	Koncentrace kobaltu [µg·kg^{-1}]	Koncentrace chromu [µg·kg^{-1}]
Tisza (prach) BIO	3115,4 (126,9)	534,2 (31,1)	5036,6 (252,3)
Fedora (tříděná)	4440,8 (261,1)	234,3 (21,4)	1536,6 (102,4)
Tiborszalasi BIO	2758,1 (215,6)	102,2 (4,8)	154,4 (8,0)
Finola (tříděná) BIO	1852,9 (59,6)	175,8 (3,3)	687,5 (55,0)
Ferimon (prach) BIO	3724,8 (246,2)	513,3 (25,0)	4935,3 (244,3)
Tiborszalasi (tříděná) BIO	1985,0 (119,5)	56,4 (3,0)	246,1 (21,5)
Tisza (tříděná) BIO	1791,0 (86,7)	78,9 (5,9)	446,2 (11,6)
Fedora BIO	2347,6 (134,5)	333,6 (28,6)	1467,8 (87,8)
Tisza (pelety tříděné) BIO	2041,6 (55,3)	92,6 (7,9)	1111,9 (78,4)
Tiborszalasi (pelety tříděné) BIO	1876,4 (101,9)	119,1 (5,9)	7683,3 (672,9)
Kompolti (tříděná) BIO	1141,0 (46,4)	108,6 (4,7)	542,8 (20,5)

Tab. 9: Průměrné parametry rostlin v 28. dnu, v závorkách uvedena směrodatná odchylka (n=6)

Odrůda	Monoica (Kontrolní)	Monoica (Těžké kovy)	Bialobrzeskie (Kontrolní)	Bialobrzeskie (Těžké kovy)
Doba klíčení [dny]	7		3	
Klíčivost [%]	71		80	
Kořenový systém [g]	3,589 (0,917)	4,468 (2,720)	5,092 (1,164)	4,568 (1,108)
Stonek [g]	8,200 (1,572)	8,099 (2,394)	10,986 (2,020)	11,800 (2,745)
Listy [g]	11,009 (1,727)	9,172 (3,756)	12,271 (2,804)	11,616 (2,869)
Výška [cm]	79,33 (7,03)	74,83 (9,41)	82,5 (4,72)	80,08 (2,33)
Obsah sušiny, kořen [%]	11,61	11,44	10,23	11,19
Obsah sušiny, stonek [%]	19,09	18,20	19,60	19,03
Obsah sušiny, listy [%]	21,20	23,17	20,98	20,83

Toleranční index pro tento experiment byl vypočítán z výšky rostlin a vyprodukovaných biomas (Wilkins, 1978), délky kořenového systému měřeny nebyly. Toleranční index je počítán následovně:

$$TI = \frac{l_{těžké\ kovy}}{l_{kontrolní}}; TI = \frac{m_{těžké\ kovy}}{m_{kontrolní}}$$

Vysoké hodnoty indexů naznačují odolnost rostlin vůči vysokým koncentracím toxických kovů, došlo i k vyšší produkci biomasy testovanými rostlinami než kontrolními.

V práci autorů Shi a Cai (2009) lze pozorovat podobné hodnoty tolerančních indexů pro koncentrace kadmia 50 $mg \cdot kg^{-1}$ vztažené na délku rostliny a biomasu kořenů nicméně biomasa prýtu se velmi liší. Rozdílnost v produkci biomasy prýtu může být zapříčiněna rozdílným přístupem k experimentu, během kterého byly rostliny vystaveny účinkům kovů po dobu 28 dní.

Tab. 10: Toleranční indexy odrůd konopí, výpočet z výšky rostliny a vyprodukovaných biomas kořenů a prýtů

Odrůda	Toleranční index		
	Délka	Prýt	Kořen
Bialobrzeskie	97,07%	100,69%	89,72%
Monoica	94,33%	89,91%	124,47%

4.3 Distribuce kadmia

Koncentrace kadmia byla výrazně vyšší jak v kořenech tak i v prýtech rostlin v porovnání s koncentrací olova. Kadmium bylo i ve velké míře transportováno z kořenů a byly naměřeny vysoké koncentrace ve stoncích i listech (viz tab. 11). Koncentrace kadmia byly obecně vyšší v rostlinách odrůdy Monoica, a to v kořenech o 9,6 %, ve stoncích o 31,6 % a v listech o 50,1 % než v rostlinách odrůdy Bialobrzeskie (tab. 11). Koncentrace v listech kontrolní skupiny odrůdy Bialobrzeskie je uvedena bez směrodatné odchylky, jelikož dvě ze tří měření byla pod limitou detekce.

Poměry koncentrací kadmia v orgánech jsou v experimentu Petrové et al. (2012) taktéž sestupné, nicméně nejsou zcela souhlasné, celkově jsou koncentrace vyšší pro odrůdu Bialobrzeskie v kořenech a stoncích. Souhlasné koncentrace byly naměřeny pouze v kořenech a stoncích odrůdy Monoica. Rozdílný přístup v tomto experimentu byl ve vystavení rostlin těžkým kovům až po 28. dnu růstu. U takto starších rostlin byla naměřena výrazně nižší koncentrace kontaminantů v listech a to u obou odrůd 2,5 krát nižší.

4.4 Distribuce olova

Množství olova v pletivech nedosahovalo, tak vysokých koncentrací jako kadmium i přes dvakrát vyšší koncentraci v ošetřujícím roztoku. Z výsledků je patrné, že nedochází k tak intenzivnímu transportu vzhůru do prýtů. Opět v odrůdě Monoica byly naměřeny vyšší koncentrace, v kořenech o 82,3 %, ve stoncích o 25,0 % a nakonec v listech o 4,2 % více (tab. 12). Jako v případě kadmia byla u vzorků listů kontrolní skupiny koncentrace ve dvou ze tří případů pod limitou detekce, proto je údaj uveden bez směrodatné odchylky.

Tab. 11: Stanovené koncentrace kadmia v jednotlivých orgánech rostlin, v závorkách uvedena směrodatná odchylka (n=3), (*n = 1)

Roztok	Bialobrzeskie			Monoica		
	Kořen [mg·kg^{-1}]	Stonek [mg·kg^{-1}]	List [mg·kg^{-1}]	Kořen [mg·kg^{-1}]	Stonek [mg·kg^{-1}]	List [mg·kg^{-1}]
Kontrolní	0,119 (0,100)	0,031 (0,026)	0,527 (0*)	0,257 (0,100)	0,233 (0,042)	0,165 (0,020)
Roztok těžkých kovů	612,3 (52,8)	167,5 (12,9)	78,1 (4,2)	671,4 (12,8)	220,5 (19,0)	117,2 (10,9)

Tab. 12: Stanovené koncentrace olova v jednotlivých orgánech rostlin, (n=3) (*n=1)

Roztok	Bialobrzskie			Monoica		
	Kořen [mg·kg^{-1}]	Stonek [mg·kg^{-1}]	List [mg·kg^{-1}]	Kořen [mg·kg^{-1}]	Stonek [mg·kg^{-1}]	List [mg·kg^{-1}]
Kontrolní	0,282 (0,227)	0,072 (0*)	0,085 (0,404)	0,346 (0,068)	0,235 (0,013)	0,260 (0,007)
Roztok těžkých kovů	301,0 (26,3)	20,0 (2,3)	9,6 (0,8)	560,7 (43,0)	25,0 (2,5)	10,0 (0,5)

Petrová et al. (2012) pozorovala zcela odlišné koncentrace olova, v kořenech Bialobrzeskie koncentrace více jak 16 krát vyšší, 38 krát vyšší ve stoncích a totožné v listech. V odrůdě Monoica koncentrace v kořenech téměř 20 krát vyšší, ve stoncích 18 krát vyšší a podobné opět v listech. Výrazným rozdílem byla aplikace každého kovu zvlášť.

4.5 Potenciál odrůd

Biokoncentrační faktor vyjadřuje poměr mezi koncentracemi kovu v pletivech daného orgánu rostliny a v nutričním roztoku. Vyšší hodnota faktoru je spojena s odolností rostlin vůči expozici toxických účinků a s akumulací v pletivech (Ali *et al*. (2002).

$$BCF = \frac{[M]_{orgán}}{[M]_{nutriční\ roztok}}$$

Translokační faktor udává koncentraci kovu v prýtu rostliny v poměru ke koncentraci kovu v kořeni. Větší míra translokace je spojena s vyšším množstvím kovů v prýtech, které jsou následně sklízeny a zpracovávány (Shi a Cai, 2009).

$$TF = \frac{[M]_{prýt}}{[M]_{kořen}}$$

Z výsledku experimentu je patrné (tab. 13, 14), že pro dekontaminaci olovo z půd není konopí příliš vhodným kandidátem. I přes schopnost tolerovat vysoké koncentrace tohoto kovu a produkovat velké množství biomasy vzhledem k nízké mobilitě olova z kořenů do prýtů se nejeví sklízení prýtů rostlin jako efektivní. V případě kadmia došlo k intenzivnějšímu transportu. Co by do hmotnosti se nacházelo více v prýtu než v kořenech.

Tab. 13: Faktory vyhodnocené z koncentrací kadmia v jednotlivých orgánech rostlin. Množství extrahovaných kovů je vztaženo jako průměr na jednu rostlinu.

Odrůda	Biokoncentrační faktor		Translokační faktor	Extrahované množství kadmia	
	Kořen	Prýt		Kořen [µg/rostlina]	Prýt [µg/rostlina]
Bialobrzeskie	1224,68%	232,44%	18,98%	313,138	542,085
Monoica	1342,79%	319,04%	23,76%	343,030	574,139

Ačkoliv byl předpokládaný výrazný rozdíl mezi odrůdami, což například naznačovala produkce biomasy odrůdy Bialobrzeskie, která vyprodukovala o 35 % více čerstvé hmoty listí i stonků, tak po analýze a vyhodnocení je patrné, že množství extrahovaného kadmia nedosahuje takového rozdílu. V prýtech odrůdy Monoica se nacházelo o 5,9 % více kadmia. Na základě tohoto poznatku je patrná odlišnost v příjmu kovů těchto odrůd. Příčina této odlišnosti je možným předmětem dalšího výzkumu.

Tab. 14: Faktory vyhodnocené z koncentrací olova v jednotlivých orgánech rostlin. Množství extrahovaných kovů je vztaženo jako průměr na jednu rostlinu.

Odrůda	Biokoncentrační faktor		Translokační faktor	Extrahované množství olova	
	Kořen	Prýt		Kořen [µg/rostlina]	Prýt [µg/rostlina]
Bialobrzeskie	301,04%	14,62%	4,86%	153,946	68,201
Monoica	560,66%	16,95%	3,02%	286,452	61,001

5 ZÁVĚR

Byla vypracována teoretická část práce, která se věnuje fytoremediaci, konopí setému a krátce metodám pro stanovení těžkých kovů v rostlinných vzorcích. Byly popsány čtyři základní směry fytoremediace se zaměřením na fytoextrakci a buněčné mechanismy zajišťující toleranci proti toxicitě.

Experimentální část je věnována stanovení vybraných těžkých kovů a polokovů v dodaných vzorcích konopí. Výsledky byly porovnány s potravinářskými normami udávající hraniční koncentrace kontaminantů v doplňcích stravy a bylo stanoveno, že vzorky dodané firmou HEMPOINT s.r.o. odpovídají bio kvalitě.

Posledním z cílů bylo porovnání fytoremediačních potenciálů dvou odrůd technického konopí. Zprvu byl očekáván významný rozdíl potenciálu mezi odrůdami, vzhledem k rozdílnosti vyprodukované biomasy, kterou více tvořila odrůda Bialobrzeskie. Vyšší biokoncentrační faktor byl však stanoven u odrůdy Monoica. Celkové extrahované množství kovů, které je přímo úměrné biokoncentračnímu faktoru i množství biomasy, se však u obou odrůd příliš nelišilo.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmad R., Tehsin Z., Malik S. T., Asad S. A., Shahzad M., Bilal M., Shah M. M., Khan S. A. (2016): Phytoremediation Potential of Hemp (Cannabis sativa L.) Identification and Characterization of Heavy Metal Respensive Genes. *Clean Soil Air Water* **44**, 195-201.

Ali N. A., Bernal M. P., Ater M. (2002): Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil* **239**, 103-111.

Bhargava A., Carmona F. F., Bhargava M., Srivastava S. (2012): Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management* **105**, 103-120.

Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J., Lauffer R. B. (1999): Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews* **99**, 2293-2352.

Colzi I., Arnetoli M., Gallo A., Doumett S., Del Bubba M., Pignattelli S., Gabbrielli R., Gonnelli C. (2011): Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in Silene paradoxa L. *Environmental and Experimental Botany* **78**, 91-98.

Ernst W. H. O. (1996): Bioavailability of heavy metals and decontamination of soil by plants. *Applied Geochemistry* **11**, 163-167.

Evangelou M. W. H., Ebel M., Schaeffer A. (2007): Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effects, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* **68**, 989-1003.

Dong J., Mao W. H., Zhang G. P., Wu F. B., Cai Y. (2007): Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review. *Plant Soil and Environment* **53**, 193-200.

Gaoni Y., Mechoulam R. (1964): Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society* **86**, 1646-1647.

Gilmutdinov A. K. (2017): Atomic Absoprtion, Theory In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectronomy.* 3. vydání (Lindon J. C., Tranter G. E., Koppenaal. D. W.), Academic Press Elsevier, 45-51.

Grotenhermen F. a Russo E. (2002): Cannabis and Cannabinoids: Pharmcology, Toxicology and Therapeutical Potential. The Haworth Press. 478 stran.

Grotenhermen F., M¨ller-Vahl K. (2012): The Terapeutical Potential of Cannabis and Cannabinoids. *Deutsches Ärzteblatt International* **109**, 495-501.

Hill S. J. a Fisher A. S. (2017): Atomic Absorption, Methods and Instrumentation. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectronomy*. 3. vydání (Lindon J. C., Tranter G. E., Koppenaal. D. W.), Academic Press Elsevier, 37-44

Hoagland D. R. a Arnon D. I. (1950): The Water-Culture Method for Growint Plants without Soil, 3rd ed., University of California, College of Agriculture, 39 stran.

Jahodář L. (2012): Farmakobotanika, 3. vydání, Karolinum, 278 stran.

Jia Y., Huang H., Sun G. X., Zhao F. J., Zhu Y. G. (2012): Pathways and Relative Contribution to Arsenic Volatilization from Rice Plants and Paddy Soil. *Environmental Science and Technology* **46**, 8090-8096

Kopstik G. N. (2014): Modern Approaches to Remediation of Heavy Metal Polluted Soil: A Review. *Eurasian Soil Science* **47**, 707-722.

Kotrba P., Najmanová J., Macek T., Ruml T., Macková M. (2009):Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnology advances* **27**, 799-810.

Kushwaha A., Rani R., Kumar S., Gautam A. (2016): Heavy metal detoxification and tolerance mechanisms in plants: Implications for phytoremediation. *Environmental reviews* **24**, 39-51.

Lasat M. M. (2002): Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* **31**, 109-120.

Li H. L. (1974): An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China. *Economic Botany* **28**, 437-448.

Li X., Zhang Z., Martin L. R., Luo S., Rao L. (2016): Complexation of NpO_2^+ with (2-hydroxyethyl)ethylenediamintriacetic acid (HEDTA) in aqueous solutions: thermodynamic studies and structural analysis. *Royal Society of Chemistry Advances* **6**, 114916-114926.

Linger P., Müssig J., Fischer H., Kobert J. (2002): Industrial hemp (Cannabis sativa L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. *Industrial Crops and Products* **16**, 33-42.

Luo Z. B., He J., Polle A., Renneberg H. (2016): Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnology Advances* **34**, 1131-1148.

McGrath S. P. a Zhao F. J. (2003): Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 277-282.

Mendez M. M. a Maier R. M. (2008): Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Envirinments – An Emerging Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives* **116**, 278-283.

Meyers D. E. R., Auchterlonie G. J., Webb R. I., Wood B. (2008): Uptake and localisation of lead in the root system of Brassica juncea. *Environmental Pollution* **153**, 323-332.

Morisson P. W. J., Khutoryanskiy V. V. (2014): Enhancment in corneal permeability of riboflavin using calcium sequestering compounds. *International Journal of Pharmaceutics* **472**, 56-64.

Padmavathiamma P. K. a Li L. Y. (2007): Phytoremediation technology: Hyper-accumulation Metals in plants. *Water, Air and Soil Pollution* **184**, 105-126.

Pandey V. C., Bajpai O., Singh N., (2015): Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **54**, 58-73.

Petrová Š., Benešová D., Soudek P., Vaněk T. (2012): Enhancement of metal(loid)s phytoextraction by *Cannabis sativa* L. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **10**, 631-641.

Prasad M. N. V. a Freitas H. M. D. (2003): Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* **6**, 285-321.

Sakakibara M., Watanabe A., Inoue M., Sano S., Kaise T. (2007): Phytoextraction And Phytovolatilization Of Arsenic From As-Contaminated Soils By Pteris vittata. *Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy* **12**, čl. 26.

Salt D. E., Smith R. D., I. Raskin., (1998): Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 643-668.

Seth C. S. (2011): A Review on Mechanisms of Plant Tolerance and Role of Transgenic Plants in Environmental Clean-up. *Botanical Review* **78**, 32-62.

Shi G., Cai Q. (2009): Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnology Advances* **27**, 555-561.

Shi G., Cai Q. (2010): Zinc tolerance and accumulation in eight oil crops. *Journal od Plant Nutrition* **33**, 982-997.

Small E. (2015): Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *Botanical Review* **81**, 189-294.

Systma K. J., Morawetz J., Pires J. C., Nepokroeff M., Conti E., Zjhra M., Hall J. C., Chase M. W. (2002): Urticalean Rosids: Circumscription Rosids Ancestry, and Phylogenetics Based on rbcL, trnL-F, and ndhF Sequences. *American Journal of Botany* **89**, 1531-1546.

Takhtajan A. (2009): Flowering plants, 2nd ed., Springer, 871 stran.

Tanghavel P. a Subbhuraam C. V. (2004): Phytoextraction: Role of Hyperaccumulators in Metal Contaminated Soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **70**, 109-130.

Terry N., Zayed A. M., de Souza M. P., Tarun A. P. (2000): Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 401-431.

Thomas R. (2007): Practical Guide to ICP-MS: A tutorial for Beginners, 3rd ed., CRC Press, 446 stran.

Tong Y. P., Kneer R., Zhu Y. G. (2004): Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science* **9**, 7-9.

Wilber C. G. (1980): Toxicology of selenium. *Clinical Toxicology* **17**, 171-230.

Wilkins D. A. (1978): The Measurement of Tolerance to Edaphic Factors By Means of Root Growth. *New Phytologist* **80**, 623-633.

Yadav S. K. (2010): Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**, 167-179.

Yang X. E., Jin X. F., Feng Y., Islam E. (2005): Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance/Hyperaccumulation in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 1025-1035.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	–	atomová absorpční spektrometrie
CBD	–	kanabidiol
CDF	–	angl. cation diffusion facilitators
CRM	–	certifikovaný referenční materiál
DTPA	–	diethylentriaminopentaoctová kyselina
EDDS	–	ethylendiamindijantarová kyselina
EDTA	–	ethylendiamintetraoctová kyselina
HEDTA	–	hydroxyethylendiamintetraoctová kyselina
HMA	–	angl. heavy metal ATPases
NRAMP	–	angl. natural resistance and macrophage proteins
NTA	–	nitrilotrioctová kyselina
THC	–	tetrahydrokanabinol
ZIP	–	angl. zinc/iron regulated proteins