

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin

„Vliv znečištění půd PCB na metabolismus rostlin“

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. Ing. Daniela Pavlíková, CSc.

Autor práce: Martina Samcová

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv znečištění půd PCB na metabolismus rostlin“ vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: 9.4. 2010

Podpis:

Poděkování

Mnohokrát děkuji Doc. Ing. Daniele Pavlíkovém Csc. za pomoc a podporu při vypracovávání mé diplomové práce a za trpělivost při její kontrole, dále pak panu Mgr. Markovi Neubergovi za pomoc s mým pokusem. Další dík patří celé Katedře agrochemie a výživy rostlin ČZU za to, že mi umožnila podílet se na její výzkumné činnosti.

Autorský referát

Pod skupinu polychlorovaných bifenyľů řadíme velkou skupinu látek, odvozených od bifenyľu. PCB jsou charakterizovány dvěma spojenými aromatickými jádry substituovanými na 1. až 10. místě atomem chloru. Existuje 209 kongenerů PCB.

PCB byly používány jako přenašeče tepla v průmyslových zařizováních vyžadujících ohřev na vysoké teploty, jako chladicí oleje v transformátorech napětí a jiných elektrických zařizováních, kde se uplatňují jejich výborné izolační vlastnosti a vysoká stabilita, byly používány i jako spotřební materiál, jako plastifikátory polymerů, přísada do barev, nátěrových hmot a tiskařských barev, jako součást prostředků na ochranu rostlin i pro jiné účely, a proto se jich do životního prostředí dostalo velké množství.

Tyto látky jsou schopné akumulovat se do lidských a zvířecích tukových tkání, ale i do rostlinných pletiv. Jejich přítomnost v lidských i zvířecích tukových tkáních způsobuje značné zdravotní problémy, a to např. poškození jater a ledvin, zařivací potíže, potíže s rozmnožováním, vyrážky a nádory.

Akumulaci PCB do rostlinných pletiv lze využít k odstranění těchto látek ze životního prostředí. Tento proces se nazývá fytoremediace. Fytoremediace užívá zelených rostlin k přesunu, akumulaci a odstranění polutantů z životního prostředí nebo zmírnění jejich škodlivého šíření.

Přítomnost PCB v půdě může u rostlin vyvolat stresovou reakci, která může mít různé podoby. Jednou z nich je i změna obsahu aminokyselin v rostlinách.

Cílem této diplomové práce na téma: „Vliv znečištění půd PCB na metabolismus rostlin“ bylo prozkoumat změny obsahů jednotlivých aminokyselin a obsah jednotlivých kongenerů PCB absorbovaných do rostlin.

Pro experiment byly použity čtyři rostlinné druhy, a to ředkvička, mrkev, petržel a celer. Nádobové pokusy s těmito druhy zelenin byly kontaminovány sedmi indikátorovými kongenery PCB, a to kongenerem č. 28 (2,4,4'-trichlobifenyľ), 52 (2,2',5,5'-tetrachlorbifenyľ), 101 (2,2',4,5,5'-pentachlorbifenyľ), 118 (2,3',4,4',5-pentachlorbifenyľ), 138 (2,2',3,4,4',5'-hexachlorbifenyľ), 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorbifenyľ) a 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorbifenyľ), které byly zvoleny na základě jejich vysoké koncentrace v minulosti používaných technických směsích.

Kontaminace půdy vybranými kongenery PCB (kongenery 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180) vedla ke zvýšení jejich obsahu v testovaných zeleninách. V porovnání s kontrolními nekontaminovanými vzorky došlo k nárůstu u ředkvičky o 698,3 µg/kg sušiny (17 x), u mrkve o 691,9 µg/kg sušiny (11,5 x), u petržele o 569,7 µg/kg sušiny (7,5 x) a u celeru o 749,1 µg/kg sušiny (5,5 x). Největší absorpce a akumulace sumy kongenerů PCB se tedy prokázala u ředkvičky.

Největší absorpce byla prokázána u kongeneru č. 28 (zejména u ředkvičky a celeru), dále pak u kongeneru č. 52 (také u ředkvičky a celeru), nejmenší absorpce byla u kongeneru č. 180, a to u všech sledovaných zelenin.

Výsledky experimentu ukázaly změny v obsahu vybraných aminokyselin v závislosti na kontaminaci půdy a druhu pěstované zeleniny.

- V bulvách ředkvičky rostoucí na kontaminované zemině se obsah glycinu oproti kontrolnímu vzorku zvýšil o 72,5 %, dále a-isoleucin o 58,7 %, isoleucin o 46 %, threonin až o 148 %, tryptofan až o 213,3 %, prolin o 92,7 % a kyselina asparagová o 30,7 %.
- V petrželi došlo podobně jako v případě bulv ředkvičky k nárůstu glycinu o 32,7 %. Dále byl zjištěn nárůst kyseliny glutamové o 157 % oproti kontrole, kdežto u threoninu došlo k poklesu o 55,5 % oproti kontrolnímu vzorku.
- V kořenu mrkve pěstované na půdě s obsahem PCB převažuje výrazný pokles vybraných aminokyselin v porovnání s kontrolou, a to u fenylalaninu o 45,3 % a tryptofanu o 100 %. Ke zvýšení obsahu aminokyselin oproti kontrolnímu vzorku došlo u kyselina glutamové, a to o 51,5 %, prolinu o 43,2 %, asparaginu o 50,5 %.
- U vzorku celeru došlo ke zvýšení obsahu oproti kontrolnímu vzorku alaninu o 106,7 % a sarkosinu o 102,6 %. K poklesu obsahu aminokyselin oproti kontrolnímu vzorku došlo u glutaminu o 100 % a tryptofanu o 32,5 %.

Klíčová slova

- persistentní organické polutanty
- polychlorované bifenyly
- stres rostlin
- fytoremediace
- aminokyseliny

Thesis summary

Into the group of polychlorinated biphenyls belong many components, they are the derivatives of the biphenyls. PCBs are characterized with two linked aromatic rings substituted with 1 to 10 chlorine atoms. There is nowadays 209 congeners of PCBs.

PCBs were used as a heat transporters in industrial installations for water heating working with high temperatures, as cooling oils in voltage transformers and in other electric installations, where is a great insulating property and stability needed. They were used as exhausting materials, plasticators of polymers, additives to the colours, paints and toners, components of plant protecting agents and for many other usings, therefore is an environment polluted so much with PCBs.

These substances are able to accumulate themselves into the humans and animals fat tissues and also into the plants tissues. In human and animal bodies they incur many health diseases, for example liver and kidney diseases, digestion problems, reproduction defects, rashes and tumours.

Accumulation of PCBs into the plant tissues we can use to eliminate these substances from environment. This proces is called a fytoremediation. The fytoremediation uses green plants to move, accumulate and eliminate the pollutants from environment or to reduce their harmful diffusion.

PCBs may cause the stress response in plants, which may take a different forms. One of them is change of content of amino acids in plants.

The aim of this thesis “The effect of soil polychlorinated biphenyls contamination on plant metabolism” was to explore changes to the contents of amino acids and content of congeners of PCBs absorbed into plants.

For my experiment were used four plant species, as radish, carott, parsley and celery. The pot experiment with these vegetables were contaminated with seven indicator PCBs congeners, congener number 28 (2,4,4'-trichlorobiphenyl), 52 (2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl), 101 (2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl), 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), 138 (2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl), 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl) a 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl), which were choosen for their concentration in technical mixtures and environmental samples.

- Contamination of soil with the PCB congeners (congeners 28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180) caused their increased content in tested vegetables. Compared with untainted control samples there was an increase in radishes by 698,3 µg/kg of solids (17x), in carrot by 691,9 µg/kg of solids (11,5x), in parsley by 569,7 µg/kg of solids (7,5x) and in celery by 749,1 µg/kg of solids (5,5x). The biggest absorption and accumulation of total PCB congeners content was detected in the sample of the radishes.
- The most absorbed PCB congener was number 28 (in radishes and celery), then number 52 (in radishes and celery), the least absorbed PCB congener was number 180 in all of the samples.

The results of the experiment demonstrated changed content of selected amino acids in relation to the contamination of the soil and the grown vegetable specie.

- In the tuber of radish grown in contaminated soil, the content of glycine is higher than in control sample by 72,5 %, next a-isoleucine by 58,7 %, isoleucine by 46 %, threonin by 148 %, tryptophan by 213,3 %, proline by 92,7 % and aspartic acid by 30,7 %.
- In parsley, as well as in case of radish, was the content of glycine higher by 32,7 %. Then an increase of glutamic acid by 157 % was found compared to the control sample, but in case of threonine the content was lower than in the control sample by 55,5 %.
- In the root of carrot grown in soil contaminated with PCB congeners dominates a higher decrease of selected amino acids compared to the control samples, phenylalanine by 45,3 % and tryptophan by 100 %. The increased content of amino acids was achieved with glutamic acid by 51,5 %, proline by 43,2% and asparagines by 50,5 %, almost the same as in the previous vegetables.
- In the sample of celery was increased alanine by 106,7 % and sarkosine by 120,6 %. The decreased content of amino acids was achieved with glutamine by 100 % and tryptophan by 32,5 %.

Keywords

- persistent organic pollutants
- polychlorinated biphenyls
- plant stress
- phytoremediation
- amino acids

Použité zkratky

ALA - alanin

aILE - a-isooleucin

AMK - aminokyseliny

ASN - asparagin

ASP - kyselina asparagová

BCCA - aminokyselina s rozvětveným řetězcem

beta-AiB - β -aminoisomáselná kyselina

ČOV - čistírna odpadních vod

DMSP - dimetylsulfoniopropionát

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DNT - dinitrotoluen

EPA - Environmental Protection Agency – Agentura pro ochranu životního prostředí

GABA - γ -aminobutyrát

GC/MSD - plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GLN - glutamin

GLU - kyselina glutamová

GLY - glycin

GSH – glutathion

HYP - hydroxyprolin

ILE - isoleucin

LEU - leucin

LYS - lysin

kongener PCB č.: 28: 2,4,4'-trichlobifenyl

: 52: 2,2',5,5'-tetrachlorbifenyl

: 101: 2,2',4,5,5'-pentachlorbifenyl

: 118: 2,3',4,4',5-pentachlorbifenyl

: 138: 2,2',3,4,4',5'-hexachlorbifenyl

: 153: 2,2',4,4',5,5'-hexachlorbifenyl

: 180: 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorbifenyl

NPK - hnojivo obsahující dusík, fosfor a draslík

PAH - polycyklické aromatické uhlovodíky

PC - fytochelatiny

PCB – polychlorovaný bifenyl
PCDD - polychlorodibenzo-*p*-dioxiny
PCDF - polychlorodibenzofurany
PCE - perchlorethen
PHE - fenylalanin
POP - persistentní organické polutanty
PRO - prolin
RNA - ribonukleová kyselina
SAM - *S*-adenosylmethionin
SAR - sarkosin
TCE - trichlorethen
THR - threonin
TNT - trinitrotoluen
TPH - parathormon
TRP - tryptofan
TSCF - transpirační koncentrační faktor
TYR - tyrosin
VAL - valin

Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce.....	3
3. Literární rešerše.....	4
3.1. Vlastnosti polychlorovaných bifenyly.....	4
3.2. Výroba a použití polychlorovaných bifenyly.....	4
3.3. Kontaminace pedosféry polychlorovanými bifenyly.....	5
3.4. Degradace polychlorovaných bifenyly.....	6
3.4.1. Fyzikálně – chemická degradace.....	6
3.4.1.1. Skládkování.....	6
3.4.1.2. Spalování.....	6
3.4.1.3. Spoluspalování čistírenských kalů odpadních vod s polychlorovanými bifenyly...7	
3.4.1.4. Termická desorpce.....	7
3.4.1.5. Chemická likvidace.....	7
3.4.1.5.1.Sodíková metoda.....	8
3.4.2. Bioremediační technologie.....	8
3.4.2.1.Obecná charakteristika bioremediace.....	8
3.4.2.2. Rozdělení bioremediačních technologií.....	9
3.4.2.3. Fytoremediace.....	10
3.5. Metabolismus xenobiotik u rostlin.....	18
3.6. Metabolismus polychlorovaných bifenyly u rostlin.....	19
3.7. Transpirační koncentrační koeficient.....	22
3.8. Stres u rostlin.....	23
3.8.1. Formy stresu u rostlin.....	23
3.9. Aminokyseliny.....	26
3.9.1. Vlastnosti vybraných aminokyselin.....	30
4. Pokus.....	35
4.1. Materiál a metody.....	35
4.2. Postup stanovení aminokyselin.....	35
4.3. Výsledky pokusu.....	39
5. Diskuse.....	52
5.1. Ředkvička.....	52

5.2. Petržel.....	53
5.3. Mrkev.....	53
5.4. Celer.....	54
6. Závěr.....	56
7. Literární zdroje.....	57

1. Úvod

Pod skupinu polychlorovaných bifenylyů řadíme velkou skupinu látek, odvozených od bifenyly (difenyly). Bifenyly je aromatický uhlovodík, v němž jsou jednoduchou vazbou spojena dvě benzenová jádra. Bifenyly lze získat pyrolýzou benzenu, působením kovů na halogenbenzeny nebo zahříváním diazoniových solí s benzenem, kromě toho je obsažen i v černouhelném dehtu, produktech pyrolýzy ropy a v ropných frakcích (teplota varu 255 - 265 °C). Jde o látku velice reaktivní, lze ji nitrovat, sulfonovat, halogenovat (chlorace, bromace). Významné použití mají především chlorované deriváty bifenyly - polychlorované bifenyly (PCB).

PCB představují skupinu 209 izomerů se sumárním vzorcem $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, kde počet atomů chloru je jeden až deset, přičemž je statisticky nepravděpodobný vznik kompletní směsi během chlorace bifenyly (internetový zdroj č. 1).

Polychlorované bifenyly (PCB) spolu s polychlorodibenzo-*p*-dioxiny (PCDD) a polychlorodibenzofurany (PCDF) jsou zástupci skupiny látek nazývaných POP (Persistent Organic Pollutants) neboli persistentní organické polutanty. Studie ukázaly jejich dlouhodobou akumulaci v půdách a sedimentech a také postupnou bioakumulaci do potravinových řetězců. Hlavní zdravotní riziko souvisí s dlouhodobou expozicí (Campanella et. al, 2001).

Chlorované bifenyly, které vstupují do organismu pokožkou, dýchacím systémem a zažívacím traktem, se podobně jako další sloučeniny skupiny persistentních organických polutantů (POP) ukládají do tukových tkání. Testy na laboratorních zvířatech prokázaly, že PCB mohou působit poškození jater a ledvin, zažívací potíže, potíže rozmnožování, vyrážky a nádory. Důsledky dlouhodobého vystavení účinku malých množství těchto sloučenin nejsou však zatím známy (Horák, 2002).

Klinickými příznaky po prodělání nemoci YUSHO a YUCHENG (způsobené vystavením PCB a dioxinům) byla tmavá pigmentace pokožky, chlorakné, větší výskyt infekčních onemocnění v důsledku snížené obranyschopnosti organismu, neurologická poškození. Těhotným ženám se rodily děti s nižší porodní hmotností, s pigmentací na kůži, nehtech, otoky v obličeji, poruchami osifikace lebečních kostí. Všechny příznaky včetně růstové retardace po čase vymizely (Vopršalová, 1997)

Popsané účinky PCB zahrnují kožní toxicitu, imunitní toxicitu, ovlivnění reprodukčních procesů, teratogenitu, poruchy štítné žlázy a kancerogenitu (Campanella et. al, 2001).

Aminokyseliny (AMK) jsou základními jednotkami proteinů, z nichž jsou proteiny syntetizovány. Mohou být také využity v energetickém metabolismu a mnoho z nich je nezbytnou složkou potravy. Analýza ohromného množství bílkovin z téměř všech myslitelných zdrojů ukázala, že všechny proteiny se skládají z 20 základních aminokyselin. S výjimkou prolinu jsou to všechno α -aminokyseliny, neboť mají karboxylovou i primární aminoskupinu na tomtéž uhlíkovém atomu. Prolin, jako jediná výjimka, obsahuje sekundární aminoskupinu, a tak je vlastně α -iminokyselinou, i když je běžně zařazován mezi aminokyseliny.

Chemická povaha AMK určuje její chemické chování, které se projevuje v biologii rostlin a ve vytváření užitkových vlastností kulturních rostlin. Aminokyseliny hrají důležitou roli v látkovém metabolismu, protože jsou zaváděny do enzymových proteinů – jsou prekurzory ostatních dusíkatých látek a mají rozsáhlou modifikační úlohu v regulaci aktivity enzymů ve všech oblastech metabolismu (Voet a Voetová, 1990; Vašákové a Vomastkové, 1992).

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je studium vlivu polychlorovaných bifenylech (PCB), jejich účinků na metabolismus rostlin, především na změny v obsahu aminokyselin.

Obsahy aminokyselin jsou porovnávány ve vzorcích ředkvičky, mrkve, petržele a celeru, a to jak mezi zmíněnými druhy zelenin, tak mezi kontrolními vzorky (pěstovanými na půdě bez polychlorovaných bifenyly) a vzorky pěstovanými na půdě s definovaným obsahem polychlorovaných bifenyly.

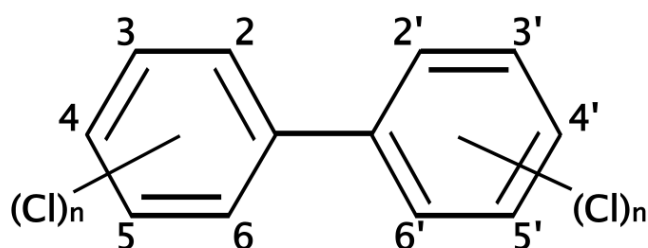
3. Literární rešerše

3.1. Vlastnosti polychlorovaných bifenyľů

PCB jsou charakterizovány dvěma spojenými aromatickými jádry substituovanými na 1. až 10. místě atomem chloru. Existuje 209 kongenerů PCB odlišujících se počtem a polohou chloru. Nicméně jen 29 molekul je zajímavých z hlediska životního prostředí. Tyto molekuly si udržují vysokou tepelnou i chemickou stabilitu. Čím více je molekula chlorovaná, tím méně je ve vodě rozpustná a těkavá. Důsledkem jsou tyto vícechlorované molekuly stabilní v životním prostředí (Campanella et al., 2001; Javorská a kol., 2004).

Podle stupně chlorace jsou PCB bezbarvé až žluté, méně chlorované PCB jsou kapaliny, vícechlorované jsou pevné látky. PCB mají nízkou tenzi par, vysokou dielektrickou konstantu, nízkou rozpustnost ve vodě, jsou snadno rozpustné v organických rozpouštědlech, olejích a tucích, jsou hydrofobní. PCB jsou velmi odolné vůči účinkům kyselin a zásad, redukci, nepodléhají oxidaci běžnými oxidačními činidly, jsou téměř rezistentní vůči hydrolýze a alkoholýze.

Toxicita PCB ještě není přesně objasněna, soudí se však, že velmi úzce souvisí se stupněm chlorace (čím vyšší počet substituentů, tím je toxicita PCB vyšší), a také s umístěním chlórů na bifenyľu (toxické jsou zejména kongenery substituované v poloze *meta* a *para*) (Totevová a kol., 1997; Zeeb et al., 2006).



3.2. Výroba a použití polychlorovaných bifenyľů

PCB byly používány jako přenašeče tepla v průmyslových zařízeních vyžadujících ohřev na vysoké teploty, dále pak jako chladící oleje v transformátorech napětí a jiných elektrických zařízeních, kde se uplatňovaly jejich výborné izolační vlastnosti a vysoká stabilita. Byly používány i jako spotřební materiál, jako plastifikátory polymerů, přísada do barev, nátěrových hmot a tiskařských barev, jako součást prostředků na ochranu rostlin i pro jiné účely (Macek et al., 2002; Mikošková a kol., 2004 a Zeeb et al., 2006)

Nátěry v zemědělství představují jejich zdroj – přecházejí pak do mléka nebo tuku jatečných zvířat (Horák, 2002).

Jedním z největších zdrojů znečištění PCB jsou skládky, odkud se dostává nejvíce PCB do povrchových a spodních vod. Menší množství uniká při odpařování barev a nátěrů, rozkladem při běžném skladování a neodbornou likvidací průmyslových kapalin.

PCB byly poprvé syntetizovány v roce 1881 a komerčně se začaly vyrábět v roce 1929. Výroba byla celosvětově omezována od konce 60. let (internetový zdroj č.1).

U nás (v ČSSR) se PCB vyráběly v CHEMKO Strážské - jejich výroba byla zastavena až k 31.12.1983. V Československu bylo vyrobeno přes 20 000 tun PCB. Dosavadní světová produkce PCB se odhaduje na 1,5 milionu tun. Předpokládá se, že z tohoto množství již 31 % uniklo do prostředí, 65 % se dosud využívá v uzavřených systémech a pouze 4 % byla likvidována ve spalovnách (internetový zdroj č.1).

3.3. Kontaminace pedosféry polychlorovanými bifenyly

Jak již bylo uvedeno, PCB patří do skupiny persistentních organických polutantů (POP). Obsahy těchto látek v zemědělských půdách ČR jsou monitorovány od počátku 90. let 20. století. Díky dlouhodobému sledování zátěže našich zemědělských půd POP bylo zjištěno, že závažné jsou vstupy POP do půdy prostřednictvím:

- imisních spadů v oblastech zvýšeného výskytu průmyslu
- zátěže ze spalování tuhých paliv v intravilánech
- kontaminované vody v inundačních pásmech některých řek
- aplikací kalů ČOV na zemědělskou půdu (Vácha, 2004).

Internetový zdroj č.3 uvádí, že se v současné době se PCB již nevyrábějí, emise pocházejí z používání výrobků a z odpadů s obsahem PCB. Malé množství PCB se také může vyskytovat v celé řadě halogenovaných sloučenin. Dalším zdrojem emisí PCB v prostředí jsou kaly z odpadních vod, používání výrobků s obsahem PCB, nelegální nakládání s odpady z těchto výrobků, spalování průmyslových i komunálních odpadů a úniky ze zařízení používajících PCB. Velké množství PCB se také uvolňuje při přehřátí nebo explozi transformátorů a kondenzátorů. Zdrojem jsou také průmyslové procesy, např. elektrárny a zpracování železa a oceli. Nejvýznamnějším zdrojem je však redistribuce již dříve uvolněných PCB. V současné době, kdy se PCB nevyrábějí a jejich používání je regulováno, jsou však nové úniky do prostředí ve srovnání s minulostí minimální.

Mezi nejvýznamnější antropogenní emise patří:

- nakládání s odpady (skládkování, spalování odpadů);
- úniky ze zařízení používajících PCB (transformátory, kondenzátory).

3.4. Degradace polychlorovaných bifenyků

3.4.1. Fyzikálně – chemická degradace

Vzhledem k vlastnostem PCB je jejich degradace fyzikálně – chemickými metodami značně náročná a hlavně drahá.

Jednou z možných metod je spalování PCB ve vysokých martinských pecích za vysokých teplot (nad 1300°C) (Totevová a kol., 1997).

3.4.1.1. Skládkování

Legislativně je povoleno ukládat vybraný tuhý odpad obsahující PCB látky do 100 mg.kg⁻¹ na několika v ČR povolených skládkách. Bohužel lze konstatovat, že některé podniky vedeny svojí ekonomickou situací, vyvážely na skládky i metalické složky kompenzačních kondenzátorů, kdy se náplň kontaminovaného oleje vylévala do společné nádrže na kapalné olejové odpady. Zvláště nebezpečné jsou metalické díly s přepážkami, z kterých se olej obtížně vylévá a které mohou (dle zahraničnických údajů) i poté obsahovat až 50 % původní dielektrické náplně (internetový zdroj č. 4).

3.4.1.2. Spalování

Rotační pece představují universální spalovací zařízení, které je užíváno ke spalování tuhých odpadů v kontejnerech, kusových, granulovaných, aj. Pece jsou rovněž používány ke spalování suspenzí, kalů a past. Toto zařízení spaluje v teplotním rozmezí od 800 °C do 1 600 °C. Rotačnických pecí je využíváno ve spalovně postavené firmou Austrian Energy pro Aliachem v Ostravě, která je jediná česká spalovna s oprávněním zneškodňovat odpady s obsahem PCB.

V ČR se vedou odborné diskuse o využívání cementářských pecí ke spolehlivému zneškodňování olejů, obsahujících látky PCB. Jsou uváděny argumenty, že teplotní slinování a doba prodlení ve spalovacích prostorách rotačnických pecí až 70 m dlouhých jsou dostačující pro úplný rozklad PCB a na druhé straně obrovský objem CaO a CaCO₃ jsou hnací silou pro dehalogenační reakce. Zahraničnické zkušenosti a hlavně pak dokonalá absence PCB, PCDD a PCDF v exhalacích jsou uváděnými argumenty pro tyto aplikace. Někteří vědci tento závěr

považují za nejednoznačný, kvůli nehomogennímu rozložení teplot při spalování a nejistotě v dehalogenačním procesu.

Dále se pro spalování PCB mohou využívat cyklónová ohniště a fluidní ohniště (internetový zdroj č. 4).

3.4.1.3. Spoluspalování čistírenských kalů z odpadních vod s polychlorovanými bifenoly

V posledním desetiletí se prosazuje v evropských zemích zákaz skládkování a kompostování čistírenských kalů, neboť obsahují v řadě případů PCB v nezanedbatelných množstvích, nemluvě o těžkých kovech. V současné době se jeví výrazný trend spoluspalovat tyto materiály ve velkých uhelných energetických zařízeních. Energetické zařízení v Heilbronnu s odsiřovací jednotkou spaluje tyto kaly v rozsahu 2-4 % (vztaženo na sušinu). Kaly je nutno předsoušet, aby se nezhoršovala kvalita emisí. Velice dobré výsledky jsou dosahovány v cirkulačních fluidních kotlích, nárůst emisí CO a N₂O byl však pozorován při spalování vlhkých kalů (internetový zdroj č. 4).

3.4.1.4. Termická desorpce

Termická desorpce je *ex-situ* proces sloužící k odstraňování těkavých a středně těkavých látek, které jsou sorbovány v odpadu. Zahříváním na teploty dostatečně vysoké (obvykle 170 až 550 °C), dojde k vytěkání těchto látek. Používá se nepřímého ohřevu k odpaření organických kontaminantů a jejich separace od tuhé fáze. Termická desorpce není metodou samonosnou a musí být doplněna technologií ke zpracování vytěkaných kontaminantů v odplynu. Obecně je tato metoda levná a je ji možno používat na odpady obsahující max. 10 % hm. organických látek a minimálně 20 % hm. tuhého podílu. Metoda je používána v USA od roku 1991 k odstraňování PCB ze zemin. Výhodou je skutečnost, že lze tímto způsobem s vysokou účinností přečistit zeminy kontaminované směsnou kontaminací, která je pro PCB kontaminace obvyklá (vedle PCB se často vyskytují i těkavé chlorované uhlovodíky nebo ropné produkty). Používá se obvykle kombinace termická desorpce s chemickou dehalogenací (internetový zdroj č. 4).

3.4.1.5. Chemická likvidace

Úvodem je třeba konstatovat, že chemická likvidace je neekonomická v porovnání se současnou praxí skládkování, ať již upravených (solidifikovaných nebo komprimovaných) nebo neupravených toxických materiálů. Toto vyplývá ze skutečnosti, že cenová politika

nezvýhodňuje procesy konečného zneškodnění škodlivin před skládkováním, které odkládá řešení problémů do budoucnosti se všemi riziky pro životní prostředí (internetový zdroj č. 4).

3.4.1.5.1. Sodíková metoda

Sodíková metoda byla komerčně využívána již v 80. letech firmou Sun-Ohio (USA) pod názvem PCBX proces (některé firmy používají název Acurex proces) k dechloraci PCB v olejích a dalších materiálech. Sloučeniny sodíku, či jiného alkalického kovu, jsou úspěšně aplikovatelné na dehalogenace převážně PCB. Reakční mechanismus je radikálový a metoda musí být z bezpečnostních hledisek dobře ošetřena. Z hlediska detoxifikace PCB je tato metoda vysoce spolehlivá, neboť k dechloraci dochází bez ohledu na stupeň dechlorace nebo stability chloru na aromatickém jádře. Významným omezením této metody je nebezpečí hoření Na, či výbušnosti systému při styku se vzdušnou vlhkostí (obsah vlhkosti < 0,1 hm. %). Z ekonomických důvodů je metoda vhodná pro znečištění materiálu PCB do 8 g.kg⁻¹. Proces zaručuje dekontaminaci pod 2 ppm PCB. I když dehalogenace materiálů kontaminovaných PCB probíhá na 100%, její praktické využití z hlediska bezpečnostního je problematické zvláště pak při využití v provozním měřítku. Při dechloraci PCB v olejích je navíc největší nebezpečí v nedokonalém zabránění emisí PCB ve formě jemné mlhy zpracovávaného PCB v odplynu (internetový zdroj č. 4).

3.4.2. Bioremediační technologie

3.4.2.1. Obecná charakteristika bioremediace

Cílem bioremediace je degradace organických polutantů tak, aby jejich koncentrace byla buď pod hranicí detekčního limitu nebo taková, že by nepřevyšovala koncentrační limit daný příslušnou vyhláškou. Bioremediace lze využít pro čištění půd, spodních vod, odpadních vod, kalů a plynů. Bioremediační technologie se v současnosti soustřeďují zejména na degradaci ropy a ropných produktů, polycyklických aromatických uhlovodíků, chlorovaných a alifatických uhlovodíků a v poslední době se ukazuje i perspektivnost využití těchto technologií pro POP, konkrétně polychlorované uhlovodíky. Praktické využití bioremediačních procesů je však limitováno řadou faktorů, které vlastní proces bioremediace v konkrétním prostředí ovlivňují.

Faktory, které ovlivňují úspěšnost použité bioremediační technologie jsou následující:

- přítomnost organismů (mikroorganismů, rostlin), které jsou schopné efektivně degradovat polutant,

- schopnost těchto organismů transformovat organický polutant akceptovatelnou rychlostí na výslednou koncentraci polutantu povolenou zákonem,
- při degradaci vznik látek (meziproduktů), které by v dosažené koncentraci nebyly toxické,
- na kontaminované lokalitě přítomnost dalších chemických látek nebo jejich směsi, které by potlačovaly růst a metabolickou aktivitu degradační mikroflóry,
- dostupnost polutantů mikroorganismům,
- na lokalitě zajištění nezbytných podmínek stimulující růst a degradační metabolismus použitých organismů, např. organické živiny, kyslík nebo vhodné akceptory elektronů, stopové prvky, vlhkost prostředí, odpovídající teplota, pH, zdroj uhlíku a energie pro růst, induktor katabolické dráhy,
- cena technologie musí být nižší nebo při nejhorsím stejná jako cena jiné technologie schopné destruovat cílový polutant.

K výše uvedeným faktorům dále přistupují např. možnosti přípravy adaptovaných bakterií se zvýšenou degradační schopností nebo, v 90. letech tolik diskutované, využití geneticky modifikovaných bakterií a rostlin (internetový zdroj č.1).

3.4.2.2. Rozdělení bioremediačních technologií

Dle Singha a Warda (2004) a internetového zdroje č. 1 lze bioremediační technologie rozdělit dle místa jejich aplikace na:

- *in situ*, které jsou aplikovány přímo na zkontaminované lokalitě; jsou relativně levné, ale jejich průběh je obtížně kontrolovatelný,
- *ex situ*, ve kterých je kontaminovaný materiál odstraněn z původní lokality a buď k degradaci dochází na místě odstranění (*on site*), nebo je odstraněná kontaminovaná matrice převezena na jiné místo, kde probíhá vlastní biodegradační proces na dekontaminační ploše nebo v bioreaktoru (*off site*). Přemísťování kontaminované zeminy či spodní vody sice značně zvyšuje celkové náklady, ale proces je velmi dobře kontrolovatelný.

Mezi *in situ* technologie patří bioventing, podpořená bioremediace, přirozená atenuace a fytořemediace.

Ex situ technologie zahrnují bioremediace v suspenzním systému, bioremediace v pevné fázi, do které patří technologie jako jsou land farming a kompostování a jejich modifikace.

3.4.2.3. Fytoremediace

Javorská a kol. (2004) a internetový zdroj č. 1, Mališová (2009) a Kučerová a kol. (1997) uvádějí, že fytoremediace je definována jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci a odstranění polutantů z životního prostředí nebo zmírnění jejich škodlivého šíření. V mnoha studiích bylo prokázáno, že rostliny jsou schopné akumulovat a přeměňovat anorganické i organické polutanty. Mezi anorganické látky znečišťující životní prostředí patří především těžké kovy – mangan, zinek, kobalt, olovo, kadmium a z organických látek jsou to ropné uhlovodíky, muniční odpady (TNT, DNT), nitrosloučeniny nebo chlorovaná rozpouštědla (TCE, PCE), bojové chemické látky, polyaromatické uhlovodíky, chlorované pesticidy, organofosfátové insekticidy (parathion) a polychlorované uhlovodíky.

Pro účinnou fytoremediaci je důležité, aby znečišťující látky byly snadno dostupné kořenovému systému rostlin, který tyto látky dále transportuje do rostlinných pletiv, kde jsou přeměňovány a ukládány. Na celém procesu se podílejí také mikroorganismy, které žijí v symbióze s rostlinami, zejména v oblasti rhizosféry – kořenové části rostlin.

Dostupnost látky, pro účinnou fytoremediaci, závisí na poměru lipofility sloučenin, typu půdy a stáří kontaminantů (Macková a Macek, 2005).

Rostliny při dekontaminaci uplatňují několik mechanismů:

- přímou absorpci kořeny, následný přesun do rostlinného pletiva a akumulaci ve formě nefytotoxických metabolitů; některé rostliny absorbují organické látky přímo z kontaminované půdy; nerozpustné látky se většinou váží pevně na povrch kořenů, látky s vyšší rozpustností jsou transportovány přímo do rostlinných pletiv, kde mohou být různými detoxikačními mechanismy přeměňovány na nefytotoxické sloučeniny a dále pak ukládány např. do vakuol nebo ve formě ligninu do buněčné stěny.
- uvolňování enzymů do prostředí, které podporují mikrobiální aktivitu a biochemickou transformaci v půdě; ve vzorcích půd z kontaminovaných míst bylo identifikováno pět enzymových systémů, které se pravděpodobně podílejí na transformaci organických látek v životním prostředí. Patří mezi ně dehalogenasy, reduktasy organických sloučenin, peroxidasy, lakasa (fenoloxidas) a nitrilasy.

- zvýšenou mineralizací látek v rhizosféře, která je typická pro činnost hub a mikrobiálních konsorcií; v kořenovém systému rostlin je obvykle přítomno nejvíce bakterií (asi 10^6 - 10^8) a dále asi 10^5 aktinomycet a 10^3 hub na gram půdy. Rostliny napomáhají mikrobiální mineralizaci v rhizosféře tím, že uvolňují do půdy látky, které mohou sloužit mikroorganismům jako zdroj uhlíku a energie pro kometabolismus organických látek znečišťujících životní prostředí. Rostlinné exudáty obsahují hlavně enzymy, alifatické a aromatické látky (fenoly, terpeny, flavonoidy), aminokyseliny a cukry. Některé z těchto látek mohou působit též jako induktory bakteriálních drah degradace některých organických xenobiotik (např. polychlorované bifenyly) (Javorská a kol. (2004) a internetový zdroj č. 1, Mališová (2009) a Kučerová a kol. (1997)).

Dle Tlustoše a kol. (2004), internetového zdroje č. 2, Macka et al. (2000), Zehnálka a kol. (2005) a Kučerové a kol. (1997) rostliny používají pro transformaci polutantů, na rozdíl od mikroorganismů, zcela odlišné mechanismy. Ty můžeme rozdělit dle způsobu uplatnění:

- Fytoextrakce (fytoakumulace) založená na schopnosti rostlin přijímat a akumulovat škodlivé látky ve svých kořenech i nadzemních částech.
- Transformace (fytodegradace) je přímá degradace organických polutantů na méně toxické nebo netoxické sloučeniny.
- Rhizosférní degradace využívá činnosti rostlin a mikroorganismů.
- Rhizofiltrace, při které dochází k adsorpci nebo absorpci polutantů, přítomných v nejbližším okolí, do kořenů rostlin. Tento mechanismus je podobný fytoextrakci, ale používá se pro odstranění polutantů ze spodních vod, spíše než z půdy. Pokusy mohou být prováděny *in situ* nebo je voda přečerpána do speciálních nádrží vyplněných kořeny příslušných rostlin. Předpěstované rostliny žijí ve vodných prostředích s nízkou hladinou kontaminace a až po určité době jsou přesazeny přímo na kontaminované místo. Z mnoha testovaných rostlin se jako jedny z nejúčinnějších ukázaly hydroponicky pěstované slunečnice, např. využívané k odstranění radionuklidů z povrchové vody v okolí Černobyli.
- Fytostabilizace napomáhá stabilizovat kontaminované místo, snaží se omezit rozšiřování polutantů např. erozí nebo prosakování do spodní vody jejich pevnější vazbou na půdní částice. Používá se při rekultivacích kontaminovaných ploch, kde přes poměrně nízké hladiny koncentrací polutantů neroste přírodní vegetace.

- Převedení do plynné fáze, kdy některé polutanty procházejí rostlinou do listů a těkají do atmosféry ve stejné nebo částečně modifikované formě. Jak bylo prokázáno u topolů, 90 % TCE (trichlorethylenu) odebraného z půdy bylo odpařeno.
- Užití rostlin pro odstranění polutantů ze vzduchu, které využívá schopnosti některých rostlin vázat polutanty přítomné v ovzduší na povrch listů např. schopnost vázat olovo zachycené z benzínových zplodin.

Americká společnost pro fyziologii rostlin (The American Society for Plant Physiology) odhaduje, že náklady na konvenční odstranění kontaminované zeminy jsou téměř desetkrát vyšší na remediaci jedné tuny zeminy než při použití fytořemediace (Macková et al., 1997).

Fytořemediace může být aplikována při odstraňování anorganických i organických polutantů přítomných v pevných částech (půda), kapalných částech (voda) a ve vzduchu. Je také známo, že fytořemediace je nejlépe využitelná na velkých plochách, kde kontaminace dosahuje maximálně do 5 metrů hloubky.

Výhodou fytořemediace jsou velmi nízké náklady, vysoká efektivita, produkce biomasy může dosáhnout až 100 tun na hektar plochy za rok. Při růstu rostlin nedochází k poškozování životního prostředí, jelikož nejsou potřeba těžké stroje ani převoz zeminy. Používání fytořemediace je též akceptováno veřejností. Podle Kučerové a kol. (1997) mezi další výhody patří minimální poškození okolí, energie na fytořemediaci se získává ze slunečního záření a má i estetický přínos.

Nevýhodou fytořemediace je negativní ovlivnění jejího průběhu a výsledné kontaminace různými vlastnostmi půdy a životními podmínkami v místě znečištění. Struktura půdního profilu, pH, koncentrace solí, polutantů a přítomnost dalších toxinů - tyto faktory mohou být limitující s ohledem na toleranci použité rostliny. Kontaminanty se mohou hromadit v listech a mohou být znovu uvolňovány (např. při opadávání listů) do prostředí. V některých případech se zvyšuje rozpustnost polutantů a může dojít k jejich rozšíření do okolního prostoru.

Oblasti kontaminované určitým typem organických látek nebo anorganických látek, vyžadují specifický typ rostlin nebo větší počet rostlin ve skupině. Často se používá vojtěška pro svojí schopnost fixovat dusík a vlastnostem kořenů, které zasahují do vhodné hloubky. Dále se pro fytořemediace osvědčily stromy z rodu *Salicaceae* (topoly a vrby), které jsou značně odolné a relativně rychle rostou. Řebříček vodní (vodní mor kanadský) (*Elodea canadensis*) byl využit pro odstraňování škodlivých látek ze spodních vod. Pokusy byly prováděny i se stolístkem (*Myriophyllum aquaticum*), který dokáže odstranit s vysokou

účinností a velmi rychle trinitrotoluen (TNT) (Tlustoš a kol. (2004), internetový zdroj č. 2, Macek et al. (2000), Zehnálek a kol. (2005) a Kučerová a kol. (1997)).

Tlustoš a kol. (2004) a Mališová (2009) uvádějí, že významnou roli při fytoremediaci mají rostliny s vysokou schopností hromadit rizikové látky – tzv. hyperakumulátory. Do této skupiny rostlin můžeme zařadit např. huseníček Hallerův (*Arabidopsis hallerii* L.) nebo peníze modravý (*Thlaspi caerulescens*), který dokáže vázat až 30 g.kg⁻¹ niklu, 43 g.kg⁻¹ zinku a 2 g.kg⁻¹ kadmia a olova. Jeho nedostatkem je však malá tvorba biomasy.

Fytoremediace se velice často využívá při odstranění těžkých kovů z prostředí. Je známo, že rostliny pro zvýšení příjmu některých prvků, např. železa, vytváří v rhizosféře prostředí zvyšující rozpustnost a pohyblivost těchto prvků. U vstupu těžkých kovů listy (foliární příjem) je situace pravděpodobně ještě méně jasná, než jak je tomu u příjmu živin prostřednictvím kořenů. Vliv těžkých kovů byl experimentálně studován u více než 200 druhů rostlin. Těžké kovy vstupují do rostlin z půdního roztoku kořeny, jejich transport je pak ovlivněn celou řadou mechanismů. První selektivní překážkou pro vstup těžkých kovů do rostlin je buněčná stěna. Je známo, že při vstupu do buněčné stěny se těžké kovy mohou vázat do celé skupiny chemických sloučenin, především polysacharidické povahy (pektiny aj.). Interakce kovů s buněčnou stěnou, jak se podle současných výzkumů zdá, není přímo regulovaná. Avšak právě změny koncentrace H⁺ iontů mohou vést k pohybu těžkých kovů k cytoplazmatické membráně. Prostup přes cytoplazmatickou membránu je proces, který je zcela jistě velmi přísně regulován řadou specializovaných přenašečových kanálů, ať již za spotřeby energie, nebo za využití přesně regulovaného gradientového přesunu iontů. Těžké kovy transportované do cytoplazmy buněk mohou být přímo vázány do sloučenin obsahující ve své molekule síru – metallothioneinu podobné proteiny, glutathion (GSH) a fytochelatiny (PC). Fytochelatiny jsou peptidy mající schopnost vázat těžké kovy. Ze syntetizovaných PC vzniká za přítomnosti iontů kovů M-PC komplex (M: Cd, Hg, Ag, atd.), který je označován jako LMW M-PC komplex (nízkomolekulární komplex), kde jsou cysteinovými rezidui vyvázaný těžké kovy. Takto vzniklý komplex přejde přes membránu tonoplastu do vakuoly. Ve vakuole je LMW M-PC komplex přeměněn na HMW MPC komplex (vysokomolekulární komplex) pomocí inkorporace S²⁻. Mechanismus detoxikace prostřednictvím PC byl doposud prokázán u kadmia, stříbra, mědi a arsenu. Nejlepším aktivátorem je kadmium následováno stříbrem, bismutem, olovem, zinkem, mědí, rtutí a zlatem. Bylo prokázáno, že glutathion je výchozí molekulou pro syntézu PC. Glutathion je jedním z nejrozšířenějších neproteinových thiolů, vyskytujících se prakticky ve všech buňkách rostlinných i živočišných organismů. Jeho hlavní funkce spočívá v detoxikaci celé řady organických i anorganických sloučenin,

antioxidační obraně a buněčné signalizaci. Popsané thiolové sloučeniny přímo regulují koncentraci těžkých kovů v pletivech rostlin, a tak udržují homeostázu těžkých kovů. O dalším pohybu takto vázaných kovů v celistvé rostlině je známo velmi málo. Je pravděpodobné, že dochází k redistribuci komplexů těžkých kovů (myšleno všech výše jmenovaných) pomocí vodivých pletiv rostlin. Rostlina má pro odstranění nebezpečného přebytku těžkých kovů velmi málo možností, ale přesto byly některé z nich popsány

- a) odstranění těžkých kovů v kořenových exudátech zpět do půdy
- b) ukládání do trichomů
- c) ukládání do starých listů
- d) ukládání do odumírajících pletiv – borka.

Z uvedeného vyplývá, že snahou rostliny je deponovat těžký kov na místa, kde bude zamezena jeho další pohyblivost v rostlině (EPA, 2000).

V pokusu popsaném Mališovou (2009) byla k fytořemediaci půdy kontaminované těžkými kovy (v okolí řeky Litavky na Příbramsku) použita směs listů z vrb, a to z *Salix smithiana*, *S. alba*, *S. rubens* a *S. dasyclados*. Ze získaných výsledných dat bylo patrné, že listů kontaminovaných vzorků obsahuje výrazně více kadmia (30x), olova (30x) a zinku (5x) než listů nekontaminované. Arsen, který byl v půdě obsažen také ve vysokém množství, nebyl rostlinou akumulován. V tomto pokusu byly též stanoveny obsahy některých aminokyselin. Je zřejmý vysoký výskyt kyseliny asparagové či asparaginu a glutamové či glutaminu, serinu, glycinu a cysteinu.

Kučerová a kol. (1997) uvádějí, že dalšími rostlinami uplatňovanými při fytořemediaci jsou vodní hyacinty, používané jako součást programu pro čištění užitkové vody před vypouštěním do řek. Při odstraňování lipofilních polutantů byly při testech na polích použity cukina (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina* cv. Diamant F1), dýně (*Cucurbita pepo* L. cv. Gerber Zentner) a okurka (*Cucumis sativus*). Cukiny a dýně vykazovaly vysokou schopnost akumulace dibenzofuranů z půdy, okurky pak vyšší schopnost absorpce ze vzduchu.

K identifikaci některých druhů polutantů vyskytujících se ve vzduchu, jejichž koncentrace se nedá stanovit běžnými analytickými metodami, byly užívány černé ořešáky (*Juglans nigra*), topoly (*Liriodendron tulipifera*), duby (*Quercus alba*) a javory (*Acer saccharum*, *Acer rubrum*), např. ke zjištění koncentrace PCB v Indianě. PCB se kumulují v kůře stromů a jejich koncentrace udává stupeň kontaminace oblasti.

Macková a Macek (2005) uvádějí, že stupeň akumulace polutantů ze vzduchu závisí na rozdělovacím koeficientu vodné a plynné fáze, typu polutantu, druhu rostliny, velikosti a typu povrchu listů a také na obsahu lipidů v epidermu listů. Již v polovině 70. let byla ve

Švédsku vyhodnocována schopnost různých druhů městské zeleně absorbovat polyaromatické uhlovodíky z výfukových plynů. Jako nejúčinnější se ukázal jírovec maďal (*Aesculus hippocastanum* L.), který má však v současnosti velmi sníženou aktivitu vzhledem k požeru listů klíněnkou korovcovou. V Japonsku je nyní intenzivně studována schopnost rostlin zneškodňovat oxidy dusíku.

K detoxifikaci různých organických sloučenin mají rostliny různé mechanismy. I látky značně odolné vůči degradaci mohou být některými rostlinnými druhy metabolizovány na nefytotoxické sloučeniny, ovšem nefytotoxické nemusí vždy znamenat netoxické z hlediska např. savců a zejména člověka. Může docházet i k redukci na mutagenní či karcinogenní sloučeniny. V prvním kroku jsou sloučeniny aktivovány vnesením nějaké funkční skupiny, např. hydroxylací, ve druhém kroku dochází často ke konjugaci s polární sloučeninou zvyšující rozpustnost (např. cukry nebo aminokyseliny), a ve třetím kroku je místo exkrece jako u živočichů sloučenina uložena ve vakuole, nebo např. zapolymerována do ligninu. Může docházet i k redukci některých sloučenin, i k aktivaci promutagenů na mutagenní, či karcinogenní sloučeniny (Macková a Macek, 2005).

Za účelem zjištění schopnosti vybraných druhů rostlin akumulovat PCB ve své biomase byl ve skleníku katedry agrochemie a výživy rostlin na ČZU v Praze v roce 2004 založen modelový vegetační experiment s lehkou půdou, charakterizovanou jako fluvizem, která byla obohacena přesně definovanou směsí kongenerů PCB, a to kongenery 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180, které patří mezi nejtoxičtější. Vybrané rostliny modelovaly tři různé pěstební systémy – intenzivní zelinářský s mrkví (*Daucus carota* L.) určenou pro přímou spotřebu, zatravněnou plochu s monokulturou kostřavy (*Festuca rubra* L.) a vrbu (*Salix* – klon S 391), jakožto představitele alternativního využití zemědělského fondu se specifickými fytoextrakčními schopnostmi. Výsledky prokázaly, že z pěstovaných rostlin byl jednoznačně nejvyšší obsah sumy i všech jednotlivých kongenerů stanoven v mrkvi. Maximální hodnoty byly nalezeny v kořenu, kde byla zjištěna více než pětinasobná koncentrace sumy kongenerů PCB oproti nati. Příjem PCB nadzemní biomasou kostřavy byl několikanásobně nižší, částečně i ovlivněný dobou vegetace. I přes nižší nalezené koncentrace PCB v biomase kostřavy, by se tato rostlina, díky své vysoké pokryvnosti, dala uplatnit při fytostabilizaci půd kontaminovaných PCB. Celkově nejnižší obsah PCB byl zjištěn v biomase vrb, a to jak ve větvích, tak i v listech. Tato rostlina se za účelem remediace půd znečištěných PCB jeví jako neefektivní Javorská a kol. (2005).

Chekol et al. (2004) uvádějí, že byla prozkoumána možnost absorpce a translokace PCB do kukuřice (*Zea mays* L.), kapusty (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), mrkve (*Daucus carota* L.) z kontaminovaného kalu a mrkev měla v rostlinných pletivech nejvyšší koncentraci, následovala kapusta a kukuřice. Nicméně tyto koncentrace, s výjimkou slupky mrkve, byly velice malé a nesouvisely se stupněm kontaminace polychlorovanými bifenyly v půdě. Další výsledky potvrdily, že translokace PCB do zrn kukuřice jsou nezanedbatelné.

Zeeb et al. (2006) uvádějí, že v různých pokusech bylo dokázáno, že se kongenery PCB s nižším počtem atomů chlóru nacházely hojněji v nadzemní biomase než v kořenech.

Zeeb et al. (2006) provedli pokus s absorpcí a translokací PCB devíti různými rostlinnými druhy – třemi druhy tykve obecné (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo*), dvěma zeleninami – sójou luštinatou (*Glycine max*) a tolicí vojtěškou (*Medicago sativa*), třemi trávami – kostřavou rákosovitou (*Festuca arundinacea*), chrasticí rákosovitou (*Phalaris arundinacea*) a lilíí mnohokvětou (*Lilium multiflorum*) a ostřicí (*Carex normalis*) a hodnotila jejich remediační potenciál. Rostliny byly pěstovány ve skleníku za použití třech různých zvětralých půd odebraných ze tří lokalit kontaminovaných PCB na území Kanady. Půdy byly znečištěny směsí Alocloru 1260 (obchodní název průmyslově vyráběné směsi kongenerů PCB). Bylo stanoveno celkové množství kongenerů PCB i samostatně přes 100 kongenerů PCB, a to jak v půdě, tak i v samotných rostlinných pletivech.

Výsledky prokázaly vyšší koncentrace PCB v nadzemních rostlinných pletivech než v kořenech. Nejvyšší koncentraci byla zaznamenána v kořenech kostřavy rákosovité (6500 $\mu\text{g/g}$) a nejnižší koncentrace byla stanovena v chrasticí rákosovité (47 $\mu\text{g/g}$). Kořeny jsou vystaveny vyšším koncentracím kontaminantů než ostatní části rostlin a jejich přírodní funkcí je absorbovat vodu a ostatní molekuly z půdy. PCB se mohou také adsorbovat na vnější povrch kořene, což mohlo přispět ke zjištěným zvýšeným koncentracím v kořenech. Koncentrace PCB v nadzemních rostlinných tkáních byla obecně nižší, ale detekovatelná. Nejvyšší koncentrace byla v nadzemních částech pozorována u ostřice (*Carex normalis*) (470 $\mu\text{g/g}$) a nejnižší v sóje luštinaté (0,32 $\mu\text{g/g}$). Výsledky ukázaly, že rostliny (hlavně variety *Cucurbita pepo*) jsou schopné extrahovat PCB z půdy a přemístit je z jejich kořenů do nadzemních rostlinných pletiv. Kongenery v půdě, kořenech a pletivech indikují, že tetra- a hexa-chlorbifenyly mají největší podíl v nadzemních tkáních, kdežto kongenery s větším počtem atomů chlóru (např. hepta- a okta-chlorbifenyly) mají největší podíl v kořenech. Kultivary sóji luštinaté, kostřavy rákosovité, tolíce vojtěšky, lilie mnohokvěté, ostřice,

chrastice rákosovité i tykve obecké fungovali dobře při nižších koncentracích PCB v půdě, ale většina ukázala toxický efekt v půdách s vyšší koncentrací PCB.

V níže uvedené tabulce uvádím příklady použití fytořediačních technologií pro odstranění organických i anorganických polutantů z životního prostředí.

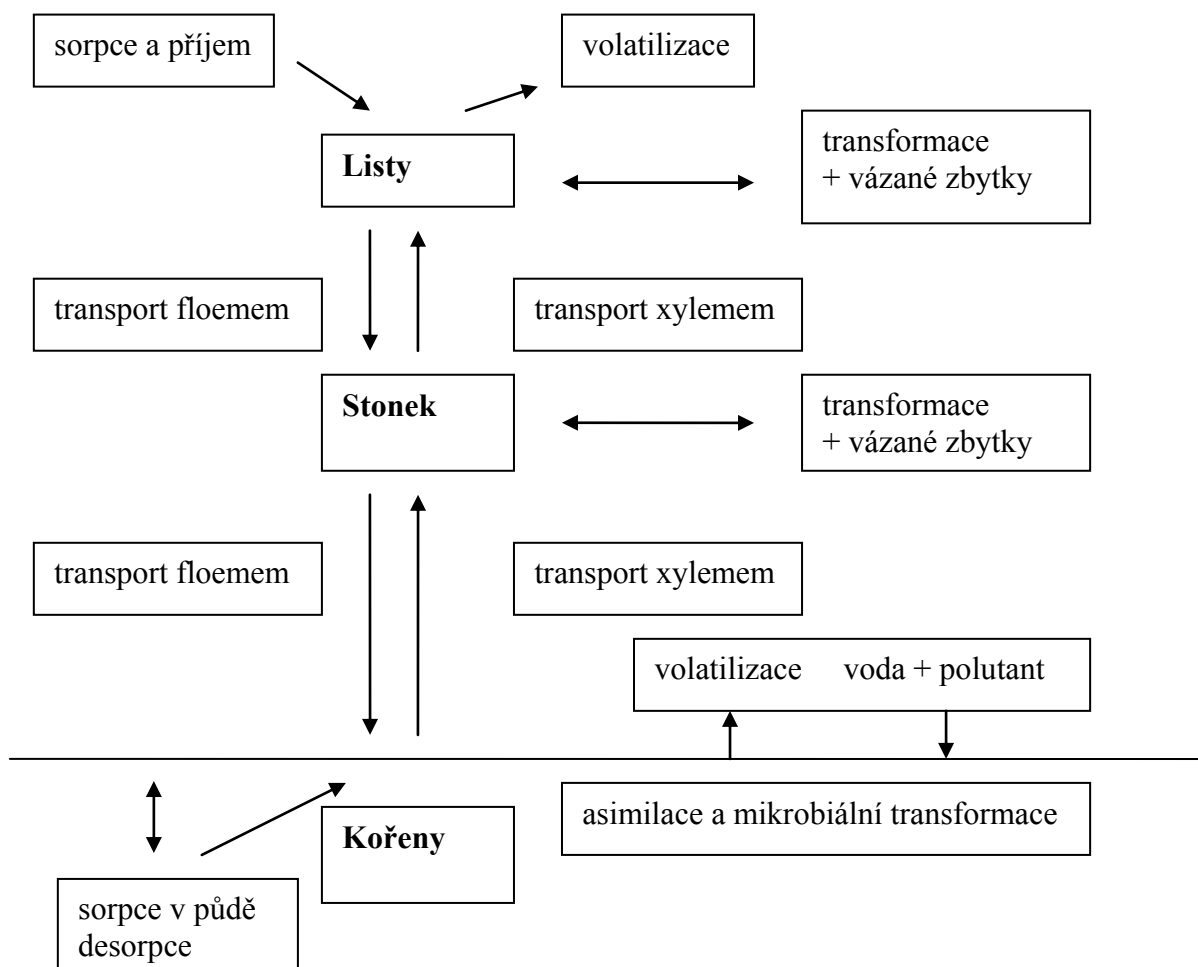
metoda	Cíl procesu	médium	kontaminanty	rostliny	Status
fytoextrakce	Extrakce a zachycení kontaminantu	Půda, sedimenty, kaly	kovy: Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn; radionuklidy: ⁹⁰ Sr, ¹³⁷ Cs, ²³⁹ Pu, ²³⁸ , ²³⁴ U	Hořčice indická, Penízeček, tařice, Slunečnice, hybridní topoly	V laboratoři, pilotní pokus, půdní aplikace
rhizofiltrace	Extrakce a zachycení kontaminantu	Podzemní a povrchové vody	Kovy a radionuklidy	Slunečnice, Hořčice indická, Hyacint vodní	V laboratoři a pilotní pokus
fytozastabilizace	omezení kontaminantu	Půda, sedimenty, Kaly,	As, Cd, Cr, Cu, Hs, Pb, Zn	Hořčice indická, Hybridní topoly, trávy	Půdní aplikace
rhizodegradace	Odstranění kontaminantu	Půda, sedimenty, Kaly, podzemní vody	Organické sloučeniny (TPH, PAH, chlorovaná rozpouštědla, pesticidy, PCB)	moruše červená, trávy, hybridní topoly, rýže, orobinec	Půdní aplikace
fytozastabilizace	Odstranění kontaminantu	Půda, sedimenty, Kaly, podzemní a povrchové vody	Organické sloučeniny, chlorované rozpouštědla, fenoly, herbicidy, výbušniny	řasy, hybridní topoly, vrba černá, tisovec dvouřadý	Půdní pokus
fytovolatilizace	Extrakce kontaminantu z média a jeho uvolnění do ovzduší	Podzemní vody, sedimenty, kaly	Chlorovaná rozpouštědla, některé anorganické prvky (Se, Hg, As)	topoly, hořčice indická, vojtěška, trnovník akát	Laboratorní a půdní aplikace
Kontrola vodního režimu	Omezení či degradace kontaminantu	Podzemní a povrchové vody	Vodorozpustné anorganické i organické sloučeniny	hybridní topol, vrba,	Půdní pokus
Vegetativní krytí (evapotranspirační krytí)	Omezení kontaminantu, kontrola eroze	Půda, sedimenty, kaly	Organické a anorganické sloučeniny	topoly, vrby	Půdní aplikace
Lužní koridory (kontrola plošných zdrojů znečištění)	Odstranění kontaminantu	Povrchové a podzemní vody	Vodorozpustné organické a anorganické sloučeniny	topoly	Půdní aplikace

Tabulka 1: příklady použití fytořediačních technologií pro odstranění organických i anorganických polutantů z životního prostředí (EPA, 2000).

3.5. Metabolismus xenobiotik u rostlin

Metabolismus xenobiotik u rostlin můžeme dle Mackové a Macka (2005) rozdělit do tří fází, přestože rostliny nemají skutečnou efektivní cestu vylučování jako živočichové. 1. fáze je **transformační**, 2. fáze je **konjugační** a 3. fázi nazýváme **fází ukládání**, která nahrazuje vylučování. Místem ukládání v buňkách jsou vakuoly a buněčná stěna pro rozpustné respektive nerozpustné konjugáty. Rostliny se podobají játrům mimo jiné i svou schopností metabolizovat široké spektrum xenobiotik, včetně polychlorovaných a polycyklických uhlovodíků.

Měřením enzymových aktivit během transformace kontaminantů smíšených s půdními vzorky bylo identifikováno pět enzymových systémů, které se pravděpodobně významně podílejí na přeměně organických látek v životním prostředí. Jsou to dehalogenasy, nitroreduktasy, peroxidasy, laktasa a nitrilasa. Následující obrázek ilustruje potenciální příjem a transformace organických polutantů v půdě.



Obrázek 1: Potenciální příjem a transformace organických polutantů v půdě (Schnoor, 2002)

3.6. Metabolismus polychlorovaných bifenyků u rostlin

Rostliny odbourávají PCB jiným mechanismem a o produktech tohoto odbourávání je známo poměrně málo.

První zmínky o přeměně PCB rostlinnými buňkami se objevily v 70. letech a jako první krok přeměny PCB byla zjištěna hydroxylace. Tím se rostlinný metabolismus podobá i metabolismu živočišnému. Při dalším studiu vznikajících hydroxyderivátů byla vyslovena hypotéza, že kongenery s chlorem v ortho poloze podléhají přeměně v rostlinných buňkách snadněji než ostatní kongenery.

V prováděných pokusech byly sledovány přeměny monochlorbifenyků a dichlorbifenyků nejprve buňkami kultury lilku - *Solanum nigrum* SNC-90. U dichlorbifenyků

pokusy potvrdily účinnější metabolizaci kongenerů s chlorem v ortho-poloze. Naopak ze tří existujících monochlorbifenyků byl nejsnadněji metabolizován 4-chlorbifenyk. V další fázi těchto pokusů byla sledována přeměna monochlorbifenyků čtyřmi kulturami rostlinných buněk (*Solanum nigrum* SNC 90 – lilek černý, *Azorella rusticana* K 54 – křen selský, *Nicotiana tabacum* - tabák viržinský, *Medicago sativa* – vojtěška setá) a srovnáním se standardy identifikovány jako metabolity některé hydroxychlorbifenyky.

Kromě hydroxychlorbifenyků byly identifikovány další možné produkty vznikající přeměnou PCB - benzoová kyselina, chlorbenzoová kyselina, hydroxybifenyky i bifenyk. Z výsledků vyplynulo, že různé rostlinné druhy mohou metabolizovat tytéž PCB na strukturně odlišné chlorhydroxyderiváty; 4-chlorbifenyk může být metabolizován na různé produkty, avšak 4-chlor-4'-hydroxybifenyk vzniká v každém případě. Během přeměny může dojít k přesmyku a přesunu polohy chloru (což bylo publikováno i dříve, jak u živočišných buněk, tak u buněk rostlinných). Přeměnou PCB rostlinnými buňkami mohou vznikat látky s jednodušší strukturou, které byly identifikovány i u mikroorganismů. Z tohoto faktu plyne i velká pravděpodobnost účasti jiných enzymových systémů než monooxygenasy cytochromu P450. Existuje velká pravděpodobnost, že rostlinné produkty PCB jsou pro bakterie snadněji dostupné a lépe degradovatelné substráty (internetový zdroj č. 1).

Ohtsubo et al. (2004) uvádějí, že cesta bifenykové degradace vedoucí přes konverzi bifenyku na meziprodukt trikarboxylovou kyselinu a benzoát, je katalyzována řadou enzymů: BphA, BphB, BphC, BphD, BphE, BphF a BphG. Nicméně účinnost a meziprodukty reakce jsou odlišné od těch pro degradaci bifenyku a závisejí na počtu a pozici atomů chloru na bifenylovém kruhu. I když se PCB skládají z mnoha kongenerů, existuje obecná korelace mezi jejich strukturou a biodegradabilitou.

Nízká vodorozpustnost PCB a jejich tendence se pevně poutat v půdě jsou limitujícími faktory pro jejich efektivní degradaci. Intracelulární degradační enzymy způsobují, že se PCB rozloží a vstoupí do cytoplasmu buňky, kde jsou metabolizovány. Jedna z cest, jak zvýšit solubilizaci (rozpustnost) je použití tenzidů. Je třeba uvést, že některé tenzidy podporující solubilizaci PCB nemusí nutně vést ke zvýšené biodegradaci PCB. Může to být způsobeno dvěma způsoby: 1. toxicitou tenzidů pro buňku a 2. zachycením PCB v micelách tenzidů, které mohou snížit biodostupnost PCB. Pro bioremediační postupy jsou vhodnější biotenzidy než syntetické, protože jsou pro buňky méně toxické a více biodegradabilní. Jedním z problémů používání tenzidů je jejich vysoká cena. Příznivá alternativa je používání biotenzidů produkovaných mikroorganismy, které rozkládají PCB.

PCB se akumulují v cytoplasmatické membráně buňky a narušují její funkci. Zdá se, že kmeny schopné degradovat PCB mají mechanismy jak zmírnit tyto účinky.

Macek et al. (2002) popisují pokus kde bylo vybráno přes 40 rostlinných kultur ze 14 druhů rostlin pro jejich schopnost transformace PCB. Schopnost přeměňovat PCB se liší u jednotlivých kultur stejných rostlinných druhů. Rostlina s nejlepší schopností konverze PCB je dle výsledků pokusů Mackové et al. (1997) a Kučerové et al. (1998, 2000 in Macek et al., 2002) klon SCN – 90 lilku černého (*Solanum nigrum*).

Chekol et al. (2004) uvádějí, že byla zkoumána schopnost adsorpce a translokace PCB kukuřicí (*Zea mays* L.), kapustou zelnou (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) a mrkví (*Daucus carota* L.) z kontaminovaného kalu z odpadních vod. Mrkev měla v rostlinných pletivech nejvyšší koncentraci PCB, následovala ji kapusta zelná a nakonec kukuřice. Nicméně byly tyto koncentrace, s výjimkou pokožky mrkve, velice nízké a nesouvisely se stupněm kontaminace půdy.

Dle Kacálkové a Tlustoše (2008) byla zjištěna schopnost rostlin kukuřice (*Zea mays*), kapusty (*Brassica oleracea*) a mrkve (*Daucus carota*) přijímat a akumulovat PCB z kontaminovaných čistírenských kalů ve své biomase, přičemž nejvyšší koncentrace v rostlinných pletivech byla zaznamenána u mrkve. Výsledky výzkumu ukazují, že některé variety dýně (*Cucurbita pepo* ssp.) jsou vysoce efektivní pro extrakci PCB z půdy, výrazně vyšší koncentrace PCB byly zaznamenány v kořenech oproti nadzemní biomase. Avšak všechny testované rostliny vykazovaly známky stresu, pokud byly pěstovány na půdách s velmi vysokou kontaminací polychlorovanými bifenyly.

Z jejich pokusu provedeném na pozemku bývalé spalovny nebezpečných odpadů v Hradci Králové vyplývá, že výsledky jednoletého experimentu prokázaly rozdílnou schopnost rostlin přijímat polychlorované bifenyly z půdy u rostlin slunečnice roční (*Helianthus annuus*), kukuřice seté (*Zea mays*) i nadzemních částí topolu (*Populus nigra* x *P. maximowiczii*). Celkově nejvyšší obsah přijatých PCB byl nalezen v kořenech kukuřice a slunečnice

výrazně nižší obsah byl nalezen v listech všech tří testovaných rostlin a ještě mírně nižší ve stoncích rostlin. U tohoto experimentu byly brány v potaz kongenery PCB č. 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180. Do budoucna je třeba pokus zopakovat a získané výsledky porovnat a také ověřit vliv půdních vlastností na poutání PCB rostlinami.

Při výběru vhodné rostliny či rostlin je velmi důležité, zda a do jaké míry ovlivňují ostatní organismy žijící v prostředí. Exudáty rostlin ovlivňují růst mikroorganismů, poskytují jim živiny a limitují tak množství mikrobiální biomasy v půdě, některé látky z rostlin mohou působit jako induktory bakteriálních degradačních drah, některé allelopatické sloučeniny inhibují růst konkurenčních rostlin a mohou ovlivňovat i složení rhizosféry mikroflory okolí. Jedná se o velice specifickou záležitost, rozdíly v účinnosti rostlin z hlediska podpory mikroflory a degradace organických sloučenin byly pozorovány i na úrovni jednotlivých odrůd. Je třeba také posoudit nakolik hrozí, že slibný rostlinný druh přenesený do nové oblasti může být invazivní a šířit se nekontrolovaně i mimo kontaminované území.

Je třeba mít na zřeteli důležitost systémů *in vitro*, neboť významně přispívají k efektivitě studia úlohy rostlin v remediaci kontaminovaných území či toků. Odstranění samotné toxické sloučeniny není jediným důležitým úkolem bioremediace, je třeba vědět, jaké produkty vznikají, jaká je jejich toxicita pro rostliny, živočichy i člověka, a jak jsou tyto látky dále metabolizovány např. půdními mikroorganismy (Macková a Macek, 2005).

3.7. Transpirační koncentrační faktor

Organické sloučeniny, které jsou akumulovány do kořenů, přecházejí xylemem do výhonků a listů. Přímá akumulace je dána tzv. účinností akumulace, která závisí na rychlosti transpirace a koncentraci kontaminantu. Účinnost příjmu pro vaskulární rostliny (pro sloučeniny, které nejsou ihned transformovány) se nazývá Transpirační koncentrační faktor (TSCF), který představuje poměr mezi koncentrací sloučeniny v transpiračním proudu rostliny a koncentrací v půdní vodné fázi. Transpirační koncentrační faktor se vypočte podle následujícího vzorce: $U = (TSCF) * (T) * (C)$, kde je

U – rychlost akumulace mg/den

TSCF – účinnost akumulace

T – transpirační rychlost L/den

C – koncentrace kontaminantu mg/L .

Pro sloučeniny, které jsou přeměňovány biochemickým aparátem rostliny na mezifázi kořen – voda, nelze výše zmíněný vztah uplatnit, neboť akumulace je dána vazbou kontaminantu na rostlinou tkáň a biochemickými reakcemi přeměny (Macková a Macek, 2005).

3.8. Stres u rostlin

3.8.1. Formy stresu u rostlin

Dle Procházky a kol. (1998), Ashrafa a Harrise (2005) a Piterkové a kol. (2005) jsou rostliny v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako *stresové faktory (stresory)*. Termín *stres* je obvykle používán pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Nejde přitom nikdy o nějaký ustálený a snadno definovatelný stav, ale spíše o dynamický komplex mnoha reakcí.

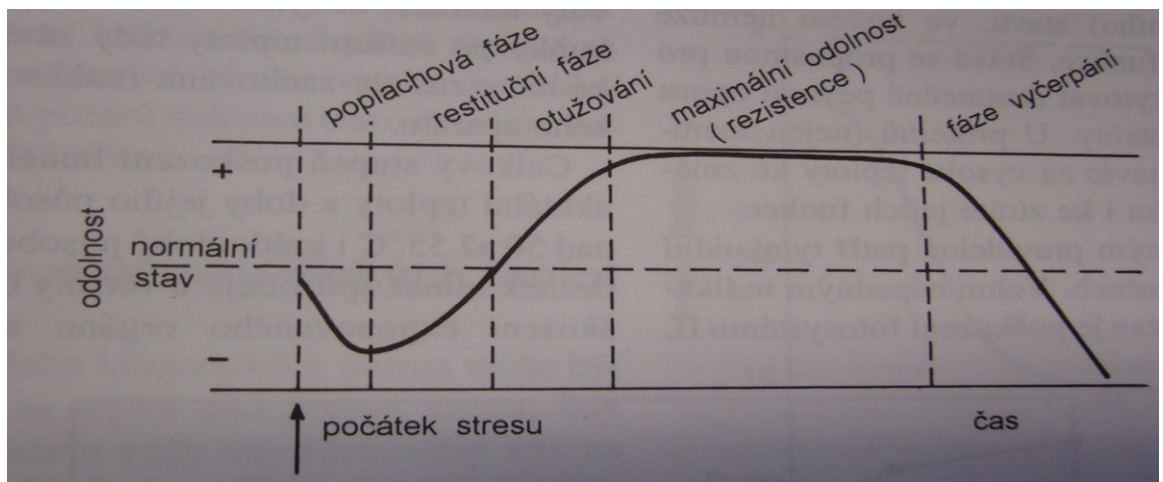
Nejdůležitější stresové faktory, se kterými se rostlina setkává v přírodě:

- abiotické faktory - fyzikální: mechanické účinky větru
nadměrné záření (UV, viditelné)
extrémní teploty (horko, chlad, mráz)
- chemické: nedostatek vody (sucho)
nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
nedostatek živin v půdě
nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
toxické kovy a organické látky
toxické plyny ve vzduchu
- biotické faktory: herbivorní živočichové (spásání, poranění)
patogenní mikroorganismy (viry, mikrobi, houby)
vzájemné ovlivnění (alelopatie, parazitismus)

Výzkum vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách obvykle začíná studiem přenosu podnětů vyvolávajících stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím a dále pak přenosem signálů uvnitř rostliny. Stresové faktory mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nesterjně snadno, a to především v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. tlustá kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn). Z fyziologického hlediska jsou mnohem zajímavější mechanismy aktivní odolnosti (stress tolerance), omezující negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí

k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, který bývá označen jako stresová reakce. Dělíme ji na několik fází:

- poplachová fáze – narušení buněčných struktur a funkcí bezprostředně po začátku působení stresového faktoru
- restituční fáze – imobilizace kompenzačních mechanismů, které směřují ...
- fáze rezistence - ...ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům
- fáze vyčerpání – při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být zvýšení odolnosti rostliny vystřídáno dalším poklesem odolnosti



Obrázek 2: Idealizovaný průběh stresové reakce u rostlin (Procházka a kol., 1998)

Základní schéma průběhu stresové reakce však nevypovídá vůbec nic o rozmanitosti vlastního působení stresorů ani o koordinaci složitého komplexu reakcí, kterými je podložena odpověď rostliny na jejich působení.

Průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako **adaptační schopnosti**. Přechodné zvýšení odolnosti získané pod vlivem stresoru nazývané jako **aklimace** může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (tvorba specifických metabolitů), tak i na změnách trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře).

Zvýšení odolnosti a opětovné ustavení homeostáze i za dlouhodobého působení stresorů bývá obvykle dosahováno jen za cenu jistých dodatečných energetických nákladů, hlavně na syntézu specifických metabolitů. I některé další změny v metabolismu zajišťující vysokou odolnost (např. udržování zvýšené koncentrace osmoticky aktivních látek) bývají

často provázeny snížením rychlosti získávání nových zdrojů hmoty a energie, a tedy i snížením rychlosti získávání nových zdrojů hmoty a energie, a tedy i snížením rychlosti tvorby biomasy.

Studium stresu u rostlin žijících v přírodních podmínkách je také komplikováno tím, že často více stresových faktorů působí současně. Interakce mezi nimi mohou podstatně měnit charakter stresové reakce ve srovnání s působením každého faktoru odděleně. Působení stresorů bývá také často omezeno pouze na část rostliny (listy či kořeny), ve které dochází k lokální stresové reakci, ale ta může druhotně způsobovat stres i v ostatních orgánech. (Procházka a kol., 1998)

Dle Singha (2004) hrají při abiotickém stresu rostlin tyto molekuly: některé aminokyseliny (především prolin), kvarterní amonné sloučeniny (např. glycinbetain, prolinbetain, β -alaninbetain a cholin-*O*-sulfát) a terciální sulfoniové sloučeniny jako 3-dimetylsulfoniopropionát (DMSP). Kvarterní amonné sloučeniny a DMSP jsou derivovány z prekurzorů aminokyselin. Důležitá je i role aminokyselin obsahujících síru, jako např. methioninu a *S*-adenosylmethioninu (SAM). Jejich role při rezistenci rostlin na stres je podíl na tvorbě cysteinu jako prekursoru peptidů (glutathionu a fytochelatinů), které tvoří cheláty s těžkými kovy a usnadňují detoxifikaci herbicidů.

Aminokyseliny alanin a γ -aminobutyrate (GABA) se výrazně hromadí v rostlinách při anaerobním stresu. O těchto aminokyselinách se hodně hovoří v souvislosti s anaerobním metabolismem uhlíku a intracelulární pH regulací.

Dle Staszkové a Táborského (2005) schopnost rostlin snížit riziko poškození vlivem chladu a mrazu je spojena s odolností vůči tomuto stresoru. Je všeobecně známo, že zvýšená odolnost rostlin k nízkým teplotám a mrazu je založena na tvorbě osmoticky aktivních látek jako jsou aminokyseliny (např. prolin, hydroxyprolin, arginin, glutamin, asparagin, threonin, γ -aminomáselná kyselina), cukry (hlavně fruktosa a sacharosa), nenasycené mastné kyseliny, dále na syntéze stresových proteinů, fytohormonů, polyfenolických sloučenin a dalších látek.

Fyziologické a biochemické působení prolinu v rostlinném organismu je mnohostranné. Abiotické a biotické stresory (chlad, mráz, vysoká teplota, sucho, zasolení, těžké kovy, napadení rostlin patogenem, atd.) jeho obsah zvyšují často již za několik hodin po nástupu stresu. Prolin může vstoupit do energetického metabolismu rostlin a tím napomoci k překonání stresové zátěže.

Dle Holubce (2005) je nejvýznamnějším chemickým vlivem na půdu a rostliny salinita a s ní často spojená alkalita. Zasolené půdy lze obecně charakterizovat jako ovlivněné

přítomností vysoké koncentrace elektrolytu nebo extrémními hodnotami pH. Tyto extrémní podmínky omezují růst většiny rostlin a slouží jako prostředí pouze pro druhy, které zde mohou přežít nebo salinitu/alkalitu tolerovat. Druhy slaných stanovišť se označují jako halofyty.

Fyziologické působení salinity na rostliny je z části fyzikálně – osmotické a z části chemické, podle druhu přítomných iontů. Aby si rostliny zachovaly turgor, koncentrace osmoticky aktivních látek v protoplastu musí přesahovat koncentraci vody v okolí kořenového systému. Většina nehalofytních rostlin omezuje růst, když osmotický tlak půdního roztoku dosáhne 2 at, pro soli-tolerantní rostliny je to až 47 at a halofyty pokračují v normálním růstu daleko za tuto hranici. Osmotický tlak buněčných roztoků může dosáhnout hodnot až 100 at. U většiny rostlin (včetně halofytů) slané podmínky výrazně omezují klíčivost semen a přežití klíčících vzešlých rostlin. Jejich úspěšné vyklíčení je omezeno na období, kdy je koncentrace solí nižší. Této skutečnosti se využívá v zemědělství. Pro vyklíčení vojtěšky je třeba vydatnou závlahou snížit koncentraci solí, a když klíčící rostliny zesílí, jsou už vůči zasolení tolerantnější.

3.9. Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) jsou základními jednotkami proteinů, z nichž jsou proteiny syntetizovány. Mohou být také využity v energetickém metabolismu a mnoho z nich je nezbytnou složkou potravy. Analýza ohromného množství bílkovin z téměř všech myslitelných zdrojů ukázala, že všechny proteiny se skládají z 20 základních aminokyselin. S výjimkou prolinu jsou to všechno α -aminokyseliny, neboť mají karboxylovou i primární aminoskupinu na tomtéž uhlíkovém atomu. Prolin, jako jediná výjimka, obsahuje sekundární aminoskupinu, a tak je vlastně α -iminokyselinou, i když je běžně zařazován mezi aminokyseliny (Voet a Voetová, 1990).

Dle Vašákové a Vomastkové (1992) jsou chemické vlastnosti aminokyselin závislé na funkční skupinách obsažených v jejich molekule. Monoaminokyseliny jsou téměř neutrální, neboť kyselý vliv jejich karboxylu (-COOH) se vyrovnává s alkalickým vlivem aminoskupiny (-NH₂). U aminodikarboxylových kyselin převládají karboxyly a proto jsou povahy kyselé. Diaminokarboxylové kyseliny jsou z podobného důvodu zásadité. Ve vodných roztocích se AMK chovají jako amfoterní elektrolyty.

Chemická povaha AMK určuje její chemické chování, které se projevuje v biologii rostlin a ve vytváření užitkových vlastností kulturních rostlin. Aminokyseliny hrají důležitou roli v látkovém metabolismu, protože jsou zaváděny do enzymových proteinů – jsou

prekurzory ostatních dusíkatých látek a mají rozsáhlou modifikační úlohu v regulaci aktivity enzymů ve všech oblastech metabolismu.

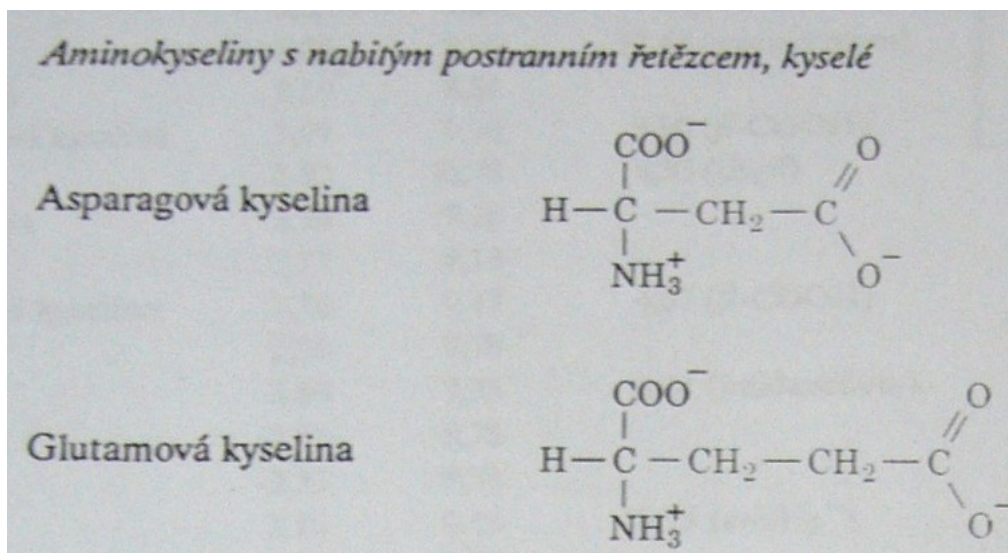
Skladbu jednotlivých AMK v rostlinné organismu lze řídit např. agrotechnikou – obděláváním půdy se podpoří její aerace a zvýší se obsah kyseliny asparagové, asparaginu a glutaminu jako prekursorů nukleových kyselin. Obsah jednotlivých AMK v jejich souboru se dá také ovlivnit šlechtěním rostlin, zásahy pomocí regulačních látek apod. Převaha nebo relativní zvýšení množství jedné AMK vyvolá posun látkového metabolismu, což se projeví ve vlastnostech odrůdy.

Zehnálek a kol. (2006) uvádějí, že kromě půdy může být zdrojem dusíku pro rostliny atmosféra. Molekula N_2 je chemicky velmi stabilní a k jejímu zapojení do oběhu v živých organismech je nezbytná její redukce na amonné ionty. Nejefektivnějším zdrojem amoniaku pro vyšší rostliny jsou bakterie rodu *Rhizobium*, které žijí symbioticky na kořenovém systému bobovitých rostlin a jejich činností je fixováno 10 až 30 g dusíku na m^2 za rok. V kořenových hlízkách se těsně spojují bakteriální buňky, které degenerují na tzv. bakteroidy s buňkami hostitelské rostliny. Bylo zjištěno, že v bakteroidu probíhá redukce dusíku na amoniak a v cytosolu buňky se tvoří kyselina asparagová, asparagin a glutamin, které se potom uplatňují v metabolismu dusíku.

Klíčovou úlohu při syntéze aminokyselin má glutamát, který v rostlině představuje pool α -aminodusíku. Skupina aminotransferáz se význačnou měrou podílí na vzájemných přeměnách aminokyselin a na mnohých syntetických pochodech, např. na syntéze sekundárních metabolitů. Uhlíkaté skelety pro různé aminokyseliny jsou odvozeny převážně z intermediátů fotosyntézy, glykolýzy a citrátového cyklu. Rostliny jsou schopny přijímat dusík i ve formě NH_4^+ a některých aminokyselin za účasti celé skupiny enzymů. Podle novějších poznatků může být na lokalitách s nízkým obsahem živin nebo s vysokým obsahem organických látek přijímán dusík v organických formách. Na těchto stanovištích vylučují kořeny rostlin zvýšené množství polyfenolů, které urychlují rozklad bílkovin na aminokyseliny. Ty jsou spolu s fenoly přijímány rostlinami a následně začleněny do metabolismu (Zehnálek a kol., 2006).

Tabulka 2: Vzorce aminokyselin obsažených v proteinech (Voet a Voetová, 1990)

Vzorce aminokyselin obsažených v proteinech	
Název	Strukturní vzorec ^a
<i>Aminokyseliny s nepolárním postranním řetězcem</i>	
Glycin	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Alanin	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Valin	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{CH}_3 \\ \quad \diagup \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \diagdown \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Leucin	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{CH}_3 \\ \quad \diagup \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \quad \diagdown \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Isoleucin	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}^*-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{H} \end{array}$
Methionin	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Prolin	
Fenylalanin	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Tryptofan	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$



3.9.1. Vlastnosti vybraných aminokyselin

Prolin hraje v rostlinách důležitou úlohu v mnoha fyziologických i biochemických pochodech. Je využíván jako zdroj respirační energie při regeneraci organismů vystavených stresovým podmínkám. Důležitost prolinu pro mikroorganismy, rostliny a živočichy nespočívá pouze v jeho významu jako význačného faktoru, který napomáhá organismu překonávat negativní vlivy prostředí (nízká teplota, sucho, zasolení, infekce), ale i ve vývojových procesech, např. při oplození, kde prolin podporuje fertilitu pylu i spermií (Vašáková, Vomastková, 1992).

Dle Frýdlové a kol. (2007) je jedním z mechanismů udržení stability buňky po působení stresových faktorů (vysoké teplotě a suchu) syntéza osmoticky aktivních látek (např. prolinu), jako adaptace na stres. Zvýšená hladina prolinu ovlivnila odpovědi aktivit antioxidantních enzymů, prolin zřejmě zasahuje do stresových odpovědí rostlinné buňky. Z pokusu s rostlinami tabáku (*Nicotina tabacum*) a transgenními rostlinami se zvýšenou produkcí prolinu, lze usuzovat, že transgenní rostliny byly méně postiženy stresovými podmínkami, v důsledku čehož byly schopny po ukončení stresu obnovit ve vyšší míře antioxidantní enzymatický systém.

Dle Sharma a Dietze (2006) má prolin jakožto proteinogenní aminokyselina různé funkce, a to např. osmolytickou, odstraňuje volné radikály, je stabilizátor makromolekul a je složkou buněčných stěn. Při zasolení se prolin kumuluje ve všech tkáních v koncentracích až 1 mol.l⁻¹. Zvýšení hladiny prolinu koreluje se zvýšenou tolerancí k zasolení.

Mnoho rostlin prolin akumuluje při vodním deficitu, zasolení, nízké či vysoké teplotě a jiných environmentálních stresech. Zvýšená regulace prolinu je často spojována s výskytem těžkých kovů a jejich příjmem rostlinami, a to již řasami.

Na základě známých vlastností může být prolin zapojen při stresu těžkými kovy různými mechanismy, a to osmo- a redox- mechanismy, tvorbou chelátů s kovy a vyplavováním volných radikálů. Role prolinu v osmoregulaci a následně delegující schopnosti rostlin odolávat vodnímu deficitnímu stresu, je dobře známá. Kavikishor et al. (1995 – IN Sharma S. S.; Dietz, K. J.; (2006). The significance of amino acid-derived molecules in plant response and adaptation to heavy metal stress.) uvedli, že transgenní tabák obsahující zvýšené množství konstitutivního prolinu je méně citlivý na inhibiční účinky osmotického stresu.

Je pravděpodobné, že prolin vyrovnává vodní deficit vzniklý v důsledku expozice těžkým kovům.

U některých rostlin byla objevena schopnost prolinu uzavřít průduchy.

Glycin, kyselina aminooctová, nejjednodušší aminokyselina, jediná proteinogenní aminokyselina bez asymetrického uhlíku, neesenciální (syntetizována ze serinu nebo glyoxylátu). Je obsažena ve větším množství hlavně v kolagenu a elastinu; je výchozím metabolitem pro biosyntézu purinových bází a hemu. V mozku se podílí na excitačních (budivých) účincích kyseliny glutamové; je významný zejména pro ukládání informací. V mozkovém kmeni, hřbetní míše a v sítnici oka obratlovců má důležitou funkci jako inhibiční (tlumivý) neurotransmitter (internetový zdroj 2).

Glycin je jednou ze sloučenin, které tvoří fytochelatiny. Fytochelatiny jsou schopné poutat rizikové prvky při obranné reakci rostliny do chelátových komplexů. Základní sekvencí polypeptidu je spojení molekul kyseliny γ -glutamové a cysteinu s jednou molekulou glycinu (γ -Glu-Cys) $_n$ Gly, kde $n = 2-11$ (Tlustoš, 2006).

Younis et al. (2008) uvedli, že glycin limituje maximální toleranci ke stresu rostliny zasolením.

Fenylalanin je jedním z produktů, ze kterých syntézou vzniká rostlinný resveratrol. V řadě studií bylo prokázáno, že resveratrol jakožto polyfenol přírodního původu je biologicky aktivní, má výrazné antioxidační vlastnosti a pohlcuje volné radikály. Nachází se v hroznech vinné révy (Šmidrkal a kol., 2001).

Dle Herrera-Rodríguez et al. (2006) byla prokázána významná role asparaginu při mobilizaci dusíku během klíčení lupiny bílé (*Lupinus albus*), fazole mungo (*Vigna radiata*) a

bavlníku srstnatého (*Gossypium hirsutum*). Ovšem míra zapojení asparaginu při klíčení nezávisí na rostlinném druhu. Zatímco role asparaginu při klíčení je relativně dobře zdokumentována, údajů o jeho účasti při stárnutí je málo a jsou poněkud rozporuplné. Na jedné straně se rostliny po sklizni nebo indukované nedostatkem světla vyznačují intenzivní syntézou asparaginu. Na druhou stranu se v klíčících rostlinách ředkviček nachází pouze stopové množství asparaginu při přirozeném stárnutí. Přesto v pokusech z 90. let byly hlášeny indukce genu asparagin-syntetázy v listí chřestu při přirozeném stárnutí, i když obsah asparaginu ve stárnoucích listech nebyl prokázán.

Glutamin a asparagin jsou důležití při transportu dusíku v rostlinách. Obsah asparaginu a glutaminu byl sledován v klíčících rostlinách slunečnice (*Zea mays*), a to od klíčení po stárnutí a byl posuzován jejich vliv při hospodaření s dusíkem v různých fázích klíčení i vzcházení. Suché semeno obsahuje mnohem méně glutaminu než asparaginu, který byl převládající během klíčení. Do konce klíčení se obsah glutaminu i asparaginu značně zvýšil. Na začátku růstového období byly hladiny glutaminu třikrát vyšší než asparaginu. Ukázal se také prudký nárůst celkového obsahu aminokyselin kolem začátku růstového období klíčící rostliny.

Hjorth et al. (2006) studovali změny v obsahu volných aminokyselin u čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) při různém stresu. Stres způsobený nízkým pH zvýšil obsah prolinu a snížil obsah histidinu a argininu v *Pennisetum clandestinum*. Obsah glutaminu, asparaginu a argininu v metličce křivolaké (*Deschampsia flexuosa* (L.) Trin.) byl zvýšen vysokým obsahem dusíku. Akumulace prolinu byla pozorována v ječmenu jarním (*Hordeum districhum* L.) a pšenici seté (*Triticum aestivum* L.) po stresu chladem, zatímco stres na kadmium u kukuřice seté (*Zea mays* L.) zvýšil obsah lysinu a methioninu a snížil obsah glutaminu a asparaginu. Akumulace prolinu byla také zaznamenána u rostlin vystavených stresu způsobeným suchem, chladem či zasolením. Zvýšení obsahu prolinu bylo také zaznamenáno při použití některých herbicidů.

Aminokyseliny cystein a methionin obsahují síru, jakožto esenciální nutriety. Rostliny a mnoho mikroorganismů jsou schopné využít anorganický sulfát a asimilovat ho do těchto aminokyselin, dále pak do ko-enzymů a vitamínů. Asimilace sulfátu v rostlinách byla podrobně studována, protože síra má mnoho funkcí v rostlinném metabolismu a při obraně proti stresu (Kopřiva et al., 2009).

Ushakova et al. (2006) uvedli výsledky svého pokusu s obsahem volných aminokyselin při stresu slanorožce rozpeštěného (*Salicornia europaea*) zasolením. V nadzemní biomase se obsah glycinu, prolinu, lysinu, argininu a kyseliny asparagové zvýšil.

Dle Joshi et al. (2010) jsou metabolické cesty threoninu, methioninu a isoleucinu v rostlinách efektivně propojeny. Jelikož threonin a methionin slouží jako substrát pro syntézu isoleucinu, jejich syntéza a katabolismus v různých vývojových fázích a při různých podmínkách prostředí ovlivňují dostupnost isoleucinu. Methioningama-lyáza a threonindeamináza udržují rovnováhu isoleucinu v rostlinách při různé dostupnosti substrátu. Obsah volných aminokyselin jako osmolytů při abiotickém stresu hraje důležitou roli v toleranci vůči tomuto stresu. Zejména akumulace aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA) jako např. leucinu a valinu je během osmotického stresu vyvolána mnohokrát. Cesty BCAA jsou v rostlinách dobře známy, protože poskytují prekurzory pro řadu rostlinných sekundárních metabolitů. Threonindeamináza a methionin γ -lyáza, stejně jako akumulace isoleucinu, jsou vyvolány osmotickým stresem.

Methionin je nutričně důležitá aminokyselina, která se v nízkých koncentracích nachází v rostlinných pletivech. Methionin je rovněž základním metabolitem v rostlinných buňkách, protože svým prvním metabolitem S-adenosylmethioninem (SAM) ovlivňuje několik klíčových sloučenin, jako např. polyamidy a biotin. SAM je také donorem primární methyl skupiny, která reguluje různé procesy v rostlinách. SAM methyltransferáza se podílí na primárním i sekundárním metabolismu. Mezi příklady patří tvorba lipidů, DNA, RNA, proteinů, pektinu, alkaloidů a fytosterolů, rovněž se podílí na syntéze chlorofylu a vonných těkavých aroma a sloučenin. U vyšších rostlin se SAM také podílí na tvorbě hormonu ethylenu, který ovlivňuje vývojová stadia včetně zrání a stárnutí. Významně se také podílí na růstu rostlin.

Přes jeho nutriční a regulační význam, faktory regulující obsah methionu v rostlinách nejsou úplně známy. Obsah methioninu je častým limitním faktorem v nutriční hodnotě plodin. Mimo jiné hraje methionin ústřední roli při zahájení transkripce mRNA (Amir, 2010).

Younis et al. (2008) zkoumali nepříznivé účinky NaCl a manitolu na obsah aminokyselin, proteinů a nukleových kyselin ve vzorkách semen bobu obecného (*Vicia faba*). Semena klíčila v médiu s přidávkou buď iontového (NaCl) nebo osmotického (manitol) stresoru. Byly prokázány významné změny v celkovém obsahu a relativním složení

aminokyselin, a to zejména u prolinu, glycinu, alaninu, serinu a kyseliny glutamové a asparagové.

4. Pokus

4.1. Materiál a metody:

Pro nádobový experiment byla vybrána půda černozem, obsahující 24,2 % jílu, 58,9 % prachu a 16,9 % písku, s pH 7,4 a obsahem organického uhlíku (C_{ox}) 1,26 %.

Nádoby se zeminou (5 kg zeminy na nádobu) byly hnojeny NPK (0,16 g P, 0,4 g K a 0,5 g N – pro ředkvičku, mrkev i petržel, 1,0 g N – pro celer na nádobu) a kontaminovány sedmi indikátorovými kongenery (IUPAC č. 28, 52, 101, 118, 138, 180; 100 μg individuálního kongeneru na 1 kg zeminy). Tyto indikátorové kongenery jsou používány k identifikaci PCB, protože se nejvíce vyskytovaly v technických směsích a vzorcích odebraných z životního prostředí. Takto kontaminované nádoby se zeminou byly osety semeny jednotlivých zelenin, a to mrkve (*Daucus carota* L. – odrůda Nantská), petržele (*Petroselinum crispum* L. – odrůda Dobra, ředkvičky (*Raphanus sativus* L. – odrůda DUO a celeru (*Apium graveolens* L. – odrůda Kompakt).

Každá varianta byla založena ve třech opakováních a současně byly založeny i kontrolní nekontaminované varianty. Po vzejití rostlin ve skleníku bylo v každé nádobě ponecháno 10 rostlin mrkve, 10 rostlin petržele, 10 rostlin ředkvičky a 5 rostlin celeru a nádoby byly přemístěny do venkovní vegetační haly. Během vegetační doby byly rostliny pravidelně zalévány demineralizovanou vodou a ošetřovány proti škůdcům a chorobám. Po sklizni byly rostliny omyty demineralizovanou vodou a rozděleny na nadzemní biomasu a kořeny. Rostliny byly sklizeny v plné tržní zralosti.

Stanovení obsahu jednotlivých kongenerů PCB ve vzorcích rostlin bylo provedeno podle modifikované metody EPA (US EPA 1999). Rostlinné extrakty byly analyzovány na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (GC/MSD) firmy Agilent Technologies typ 6890N/5975.

4.2. Postup stanovení aminokyselin

Sklizenou biomasu (ředkvička, mrkev, celer, petržel) jsem rozdrtila. Navázila jsem od každého druhu cca 1g, vložila do kádinky a zalila 10,5 ml MeOH s demineralizovanou vodou v poměru 7:3. Extrakce probíhala 48 hod. při teplotě -30°C . Po dvou dnech jsem kádinky v lednici vyndala a tekutinu slila do zkumavek určených do centrifugy (pro oddělení zbytků biomasy od vyextrahovaného roztoku). Na centrifuze se vzorky třepaly při 10 000 otáčkách/min. po dobu 20 minut. Poté jsem vodný extrakt slila do malých vialek, takže mi zůstala pouze čistá vyextrahovaná kapalina.

Za pomoci procesu Ez:faast jsem pripravila vzorky k analyze pomoci plynove chromatografie nasledovne:

1. 100 μ l vzorku jsem napipetovala pomoci specialni špičky (z Ez:faast) do vialky a špičku jsem vyhodila
2. do vialky jsem pridala 100 μ l Reagentu 1 a krátce protřepala na třepačce
3. na specialni injekčni stříkačku o objemu 1,5 ml jsem nasadila specialni špičku se sorbetem a velice pomalu (cca 1 minutu) jsem natahovala vzorek do stříkačky. Špičku jsem sundala z injekčni stříkačky a nechala ve vialce. Ve špičce mi zůstaly nasorbované aminokyseliny. Obsah z injekčni stříkačky jsem odstříkla (je už nepotřebný).
4. do vialky se špičkou jsem napipetovala 200 μ l Reagentu 2. Při tomto procesu se špička z vialky nevyndává, pouze se mírně vysune, aby vznikl prostor pro pipetu.
5. Opět jsem vzala injekčni stříkačku, nasadila na ni špičku a opět jsem roztok protáhla přes špičku (celý objem). Obsah injekčni stříkačky jsem odstříkla.
6. do vialky jsem pipetou pridala 200 μ l elučního média. Eluční médium jsem měla předpřipravené podle návodu v Ez:faast (smísení Reagentu 3A s Reagentem 3B). Promísení obou Reagentů jsem docílila opakovaným natažením kapalin do pipetování špičky.
7. Injekční stříkačku o objemu 0,6 μ l jsem naprázdno povytáhla na půlku a poté jsem natáhla roztok tak, aby se pouze dotkl filtru injekce, pak jsem roztok vypustila zpět do vialky. Špičku z injekce jsem vyhodila.
8. Speciální „zlatou“ injekcí jsem do vialky pridala 50 μ l Reagentu 4. Vialky jsem se injekcí nedotýkala, pouze jsem Reagent 4 vkápala.
9. Po dobu 5 – 8 sekund jsem obsah vialky protřepala na třepačce, poté jsem nechala roztok po dobu 1 minuty ustálit. Postup jsem ještě jednou zopakovala.
10. „Zlatou“ injekcí jsem pridala do vialky 100 μ l Reagentu 5, protřepala na třepačce a nechala 1 minutu odstát. Roztok se mi rozdělil na 2 fáze – kalnou a čirou.
11. Do nové lahvičky jsem napipetovala 75 μ l pouze čiré fáze (svrchní část rozhraní) z předchozí vialky, lahvičku jsem zavřela. Zbytek obsahu vialky jsem vylila.
12. Kapalinu z lahvičky jsem vysušila plynným dusíkem.
13. Po odpaření tekutiny jsem pridala do lahvičky 75 μ l Reagentu 6, přepipetovala do insertu (málo skleněné tyčinky) a uzavřela do původní lahvičky.
14. Tento celý postup jsem zopakovala se všemi 24 vzorky.

Obrázek 3: Sada EZ: faset pro stanovení aminokyselin (internetový zdroj č. 5)



Popis 8 kroků analýzy aminokyselin podle EZ: faset (internetový zdroj č. 6)

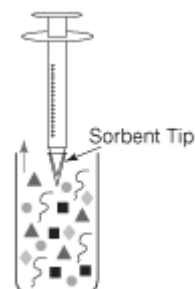
Krok 1: Smísení vzorku a interního standardu ve vialce pro přípravu vzorků (vialky)

Výhoda: interní standard pro lepší kvantifikaci



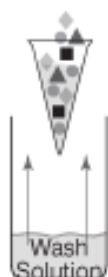
Krok 2: Nasání objemu do SPE sorbentní špičky

Výhoda: nepřejdou proteiny s dlouhým řetězcem ani močovina



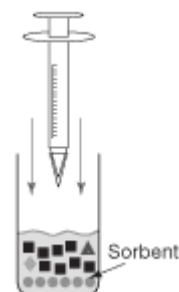
Krok 3: odstranění nečistot z SPE sorbentní špičky s promývacím roztokem

Výhoda: dokonale očištění vzorku pro snadnou a přesnou kvantifikaci



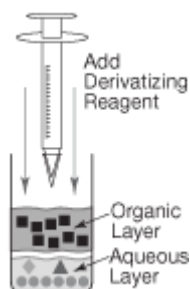
Krok 4: Vyloučení aminokyselin a SPE sorbetu ze špičky do vialky na přípravu vzorku

Výhoda: téměř žádná ztráta aminokyselin



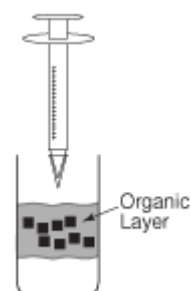
Krok 5: Přidání deprivatizačního reagentu

Výhoda: Deprivatizace je dokončena za 2 minuty, při pokojové



Krok 6: Odběr organické vrstvy obsahující aminokyseliny do vzorkovací vialky

Výhoda: další čistící krok k zabezpečení přesné a snadné kvantifikaci



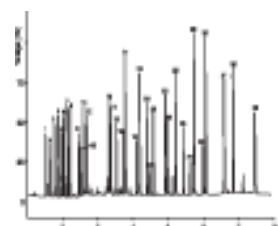
Krok 7: dokončení vyčištění a deprivatizace vzorku...
vstříknutí do plynového chromatografu nebo do kapalinového chromatografu s využitím hmotnostní spektrometrie

Výhoda: velice stabilní, zderivatizování zabrání ztrátám vzorku



Krok 8: Chromatografická analýza

Výhoda: celkové určení přes 50 aminokyselin a dipeptidů v jednom kroku



■ Amino Acid ▲ Detergent ● Protein ◆ Salt
Aminokyseliny Detergenty Bílkoviny Sole

⌋ Other Contaminants
Ostatní kontaminanty

4.3. Výsledky pokusu

MRKEV		
	vzorek s obsahem PCB	kontrolní vzorek
AMK	množství AMK [mikromol/kg]	
REDKVIČKA		
	vzorek s obsahem PCB	kontrolní vzorek
AMK	množství AMK [mikromol/kg]	
ALA	3,953714	4,219363
SAR	4,453144	4,740088
GLY	3,33778	1,93464
VAL	4,256873	3,87159
beta-AiB	8,19804	7,465464
LEU	0,835984	0,850471
aiLE	2,440746	1,538153
ILE	2,570081	1,761319
THR	5,011031	2,02059
PRO	13,25993	6,880524
ASN	12,26744	10,62383
TPR	0,438483	0,139961
ASP	9,344938	7,151329
HYP	0	0
GLU	0,577133	0,570961
PHE	0,206073	0
GLN	0	0
LYS	0	0
TYR	0	0
TRP	0	0

Po vyextrahování aminokyselin ze vzorků a následným určením jejich obsahů plynovou chromatografií mi vyšly následující výsledky:

PETRŽEL		
	vzorek s obsahem PCB	kontrolní vzorek
AMK	množství AMK [mikromol/kg]	
ALA	7,916974	8,187951
SAR	8,610724	8,872845
GLY	1,68151	1,26711
VAL	1,555893	1,632391
beta-AiB	3,053211	3,157612
LEU	0,637086	0,730874
aiLE	0,746007	0,882042
ILE	0,786307	0,846791
THR	0,556647	1,25213
PRO	0,526385	0,564897
ASN	34,33188	34,26461
TPR	0,148827	0,165683
ASP	6,767709	6,91484
HYP	0	0
GLU	1,359629	0,529082
PHE	0	0,214251
GLN	0	0
LYS	0	0
TYR	0	0
TRP	0	0

Ta
bul
ka
3:
Ta
bul
ka
4:

ALA	6,960507	7,017435
SAR	7,68251	7,719756
GLY	1,989402	2,201675
VAL	2,633593	3,008305
beta-AiB	4,819684	4,443186
LEU	2,037672	2,269342
aILE	1,438934	1,727623
ILE	1,519902	1,818854
THR	4,508851	5,86261
PRO	30,2531	17,17495
ASN	116,6403	57,78034
TPR	1,738662	1,792256
ASP	26,43683	27,13832
HYP	0	0
GLU	1,064865	0,702777
PHE	0,468941	0,856523
GLN	0	0
LYS	0	0
TYR	0	0
TRP	0	1,066037

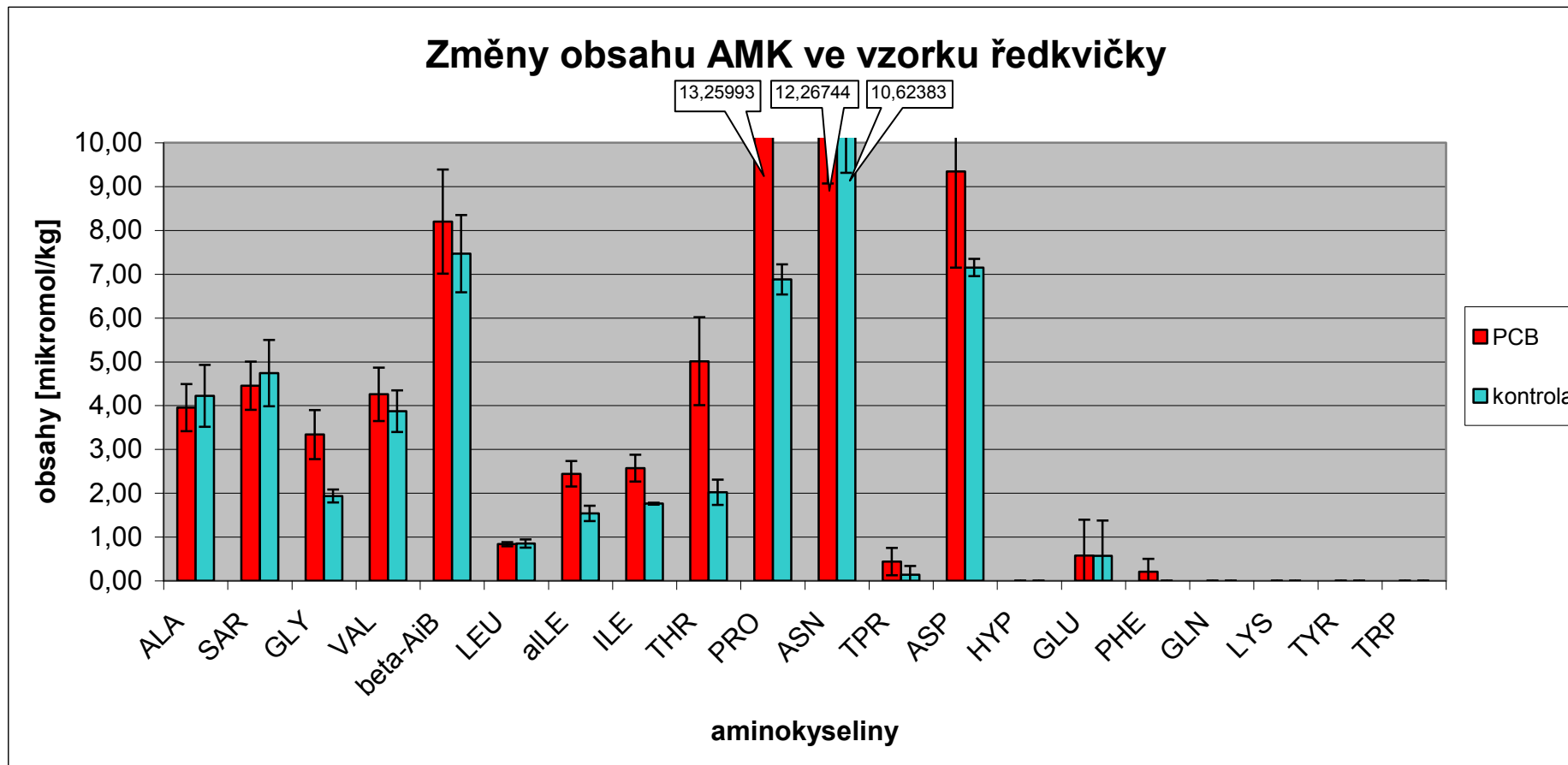
Tabulka 6:

Následuje grafické vyobrazení naměřených hodnot u jednotlivých vzorků zelenin:

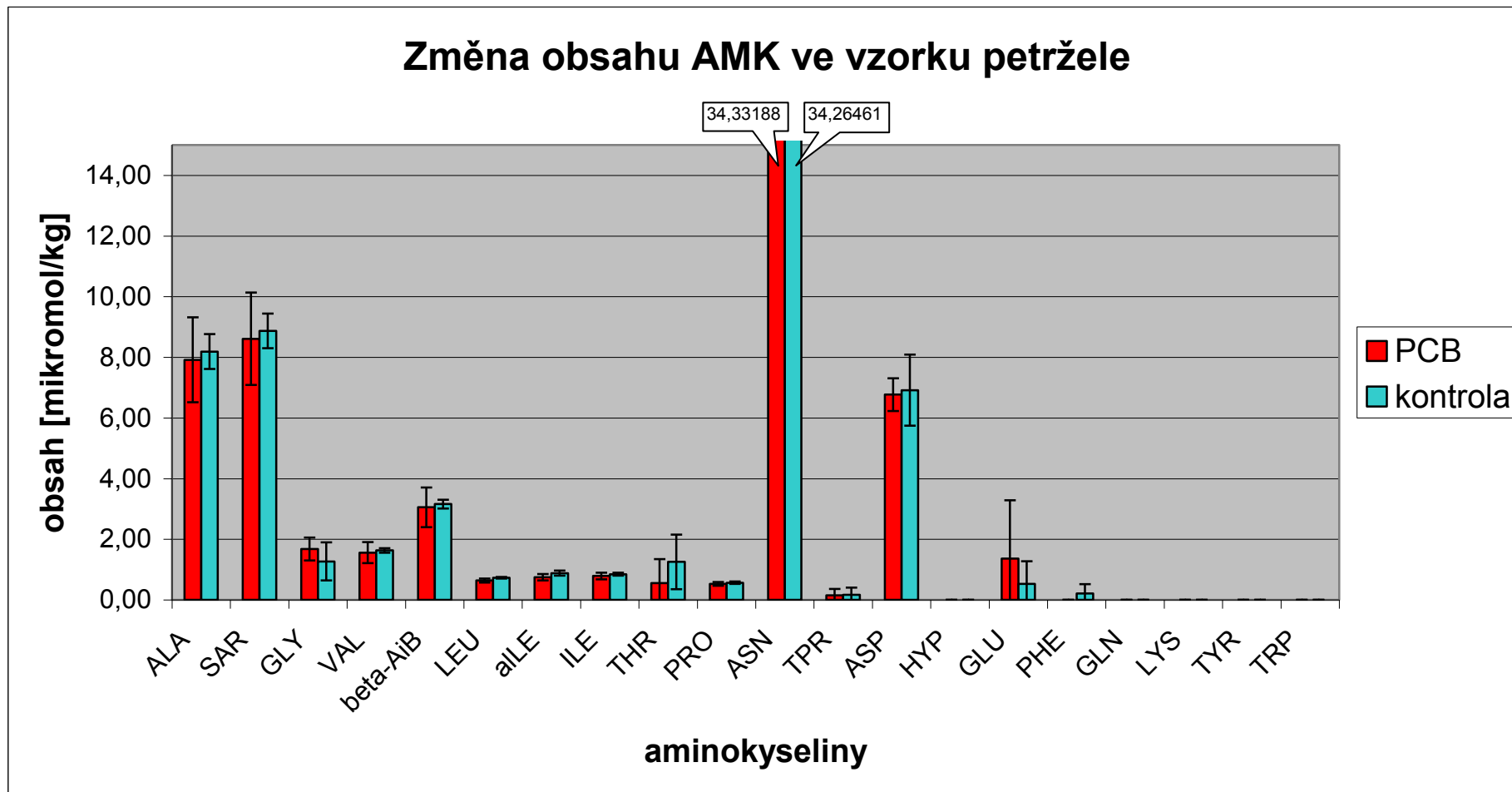
Tabulka 5:

CELER		
	vzorek s obsahem PCB	kontrolní vzorek
AMK	množství AMK [mikromol/kg]	
ALA	2,245946	1,086555
SAR	2,704668	1,334767
GLY	5,867745	5,916819
VAL	5,416313	5,654688
beta-AiB	4,512006	4,240533
LEU	11,68036	12,16487
aILE	7,771602	8,5028
ILE	8,226394	8,921633
THR	14,70539	17,56009
PRO	6,798421	7,400633
ASN	456,6323	429,2592
TPR	0	0
ASP	13,24949	15,12978
HYP	9,211653	9,644372
GLU	28,85559	30,49019
PHE	8,383732	8,592341
GLN	0	57,46352
LYS	6,361981	6,611388
TYR	5,094615	5,082232
TRP	2,641711	3,912225

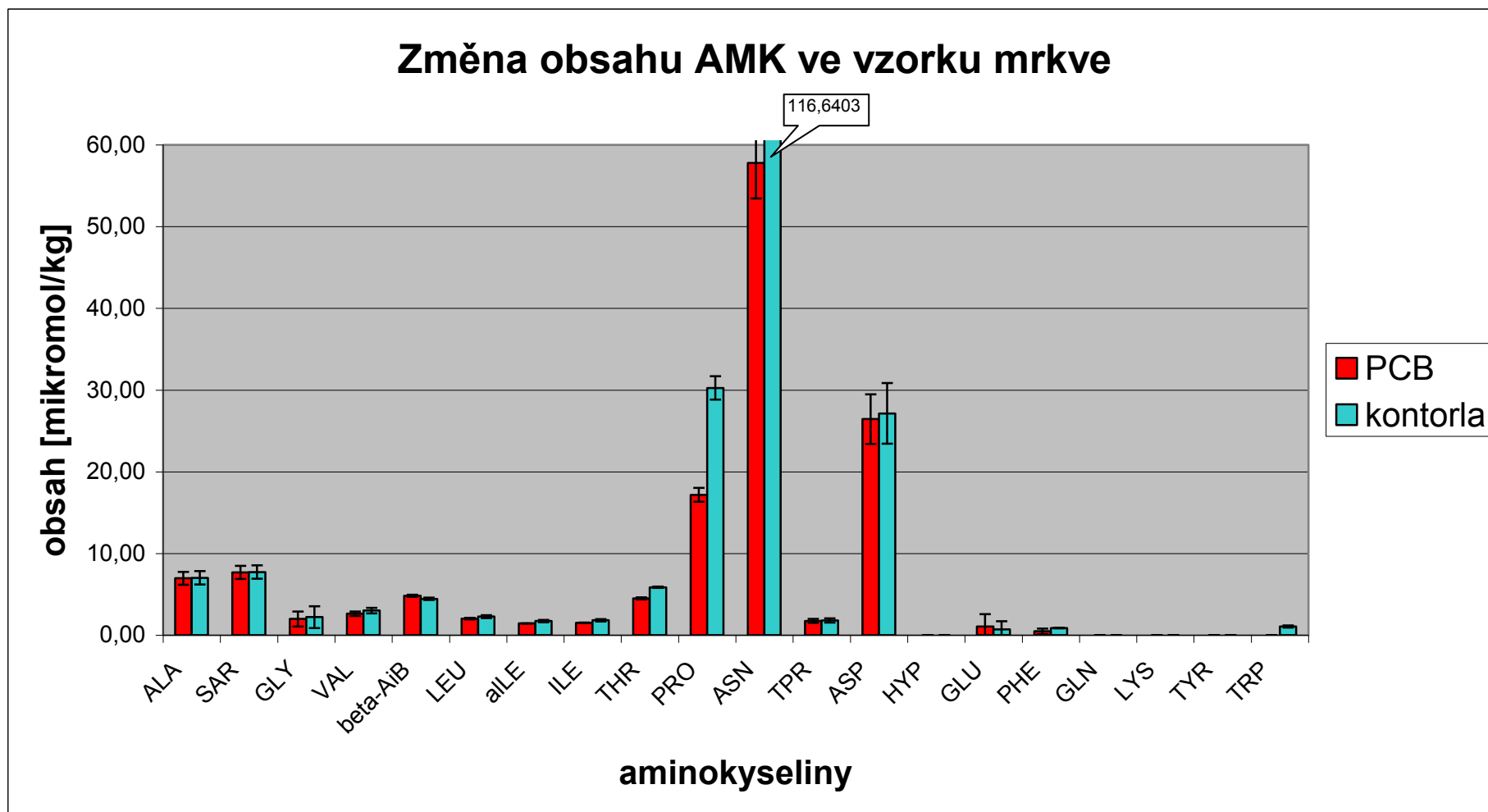
Graf 1:



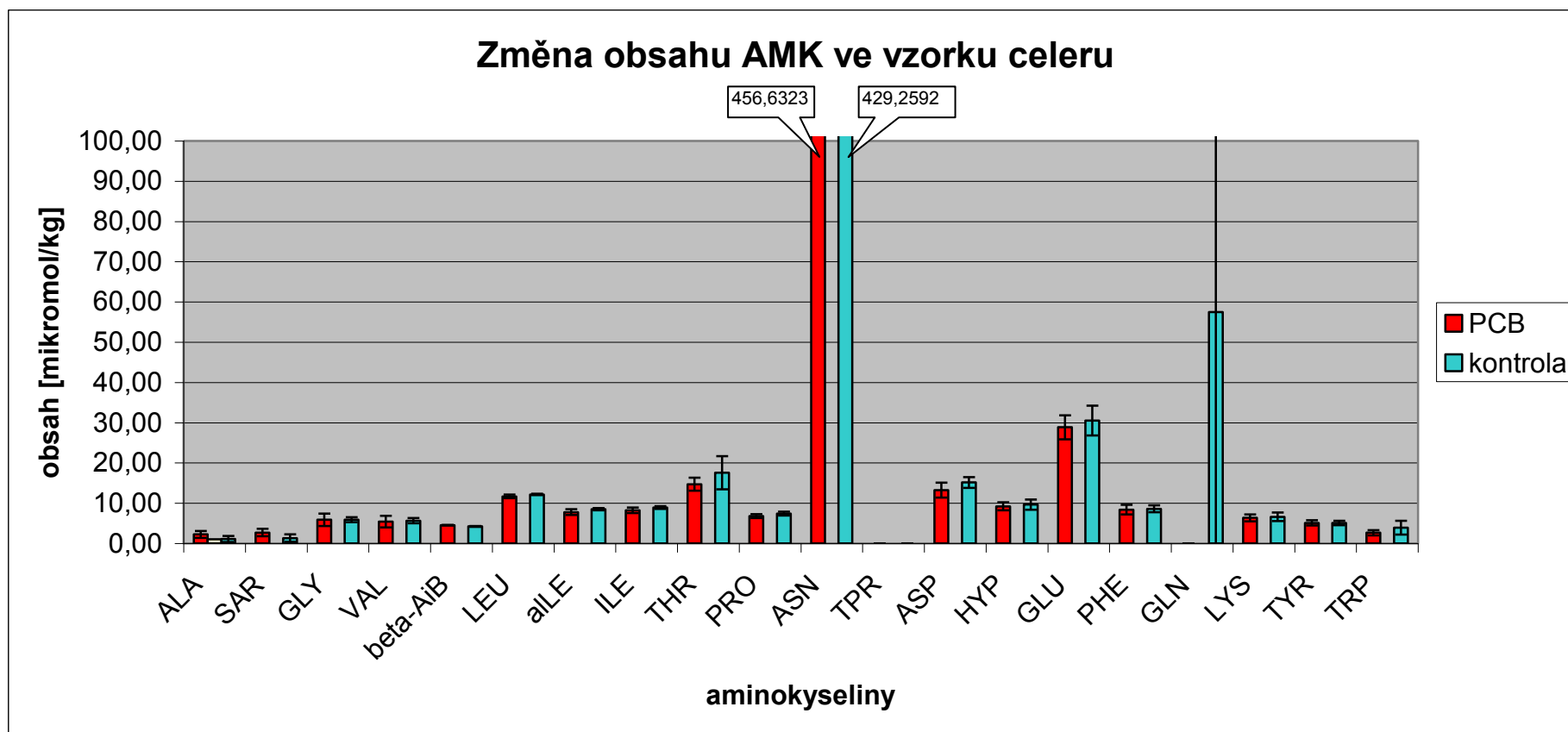
Graf 2:



Graf 3:



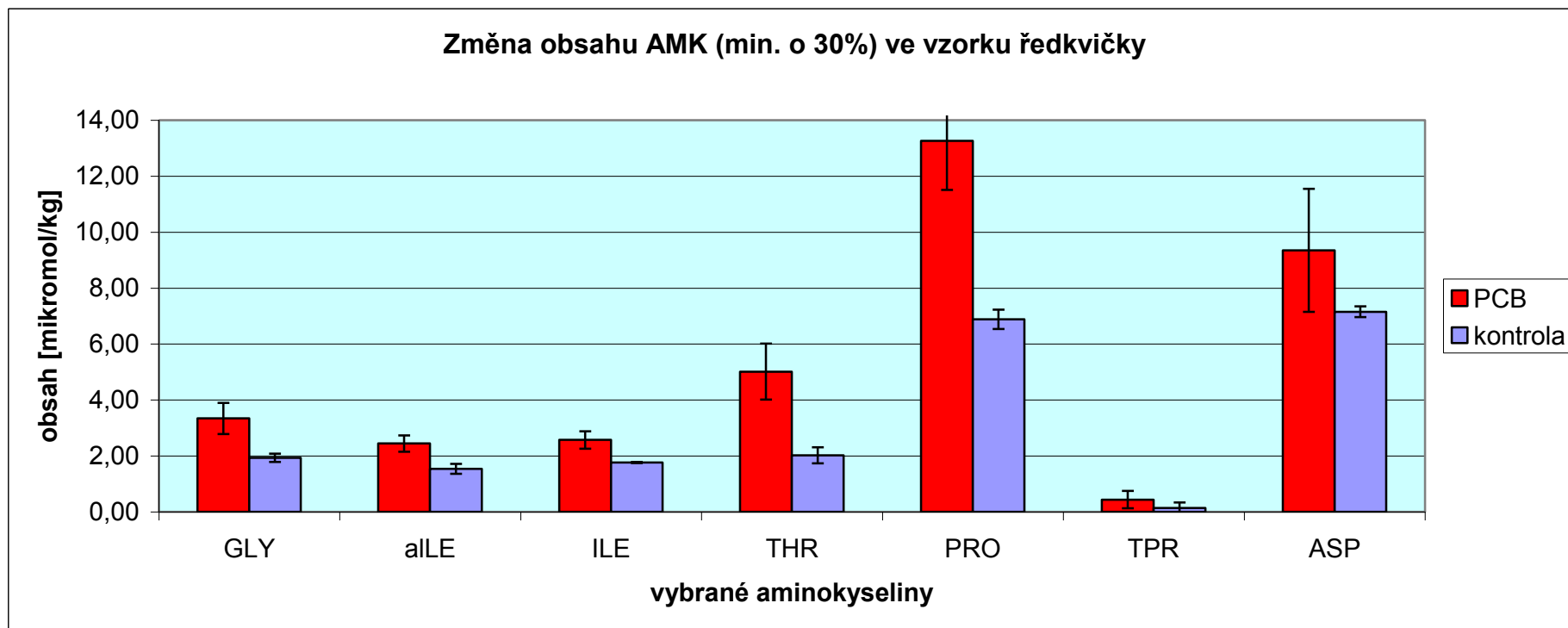
Graf 4:



Pro jasnější vyhodnocení výsledků jsem vzala v potaz hodnoty, které se od sebe u kontrolního vzorku a u vzorku pěstovaném na půdě obsahující polychlorované bifenylly (PCB) liší minimálně o 30 %. Z těchto hodnot jsou vytvořeny i následující grafy.

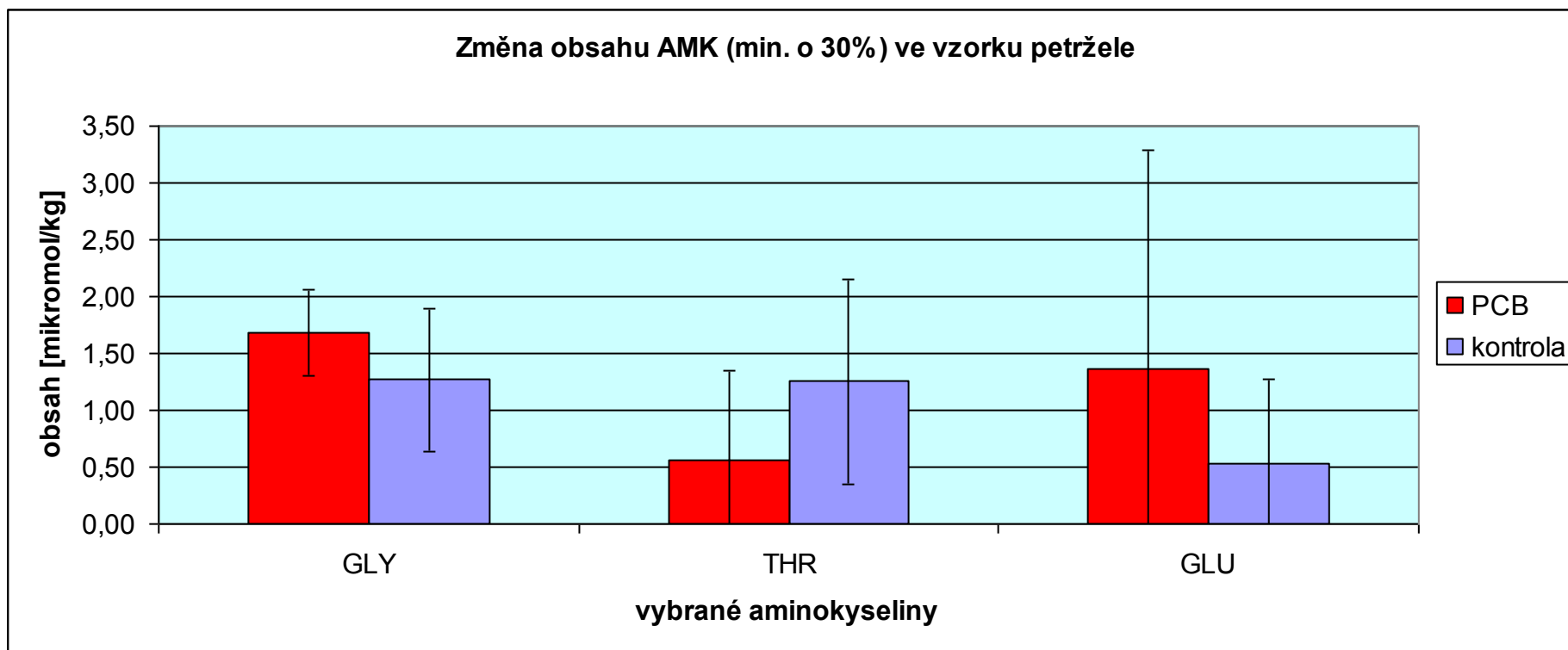
Hodnoty u vzorku ředkvičky jsem posuzovala porovnáním hodnot kontrolního vzorku se vzorkem pěstovaným s PCB. Z výsledků vyplývá, že obsah glycinu se zvýšil o 72,5 %, dále a-soleucin o 58,7 %, isoleucin o 46 %, threonin až o 148 %, tryptofan až o 213,3 %, prolin o 92,7 % a kyselina asparagová o 30,7 %.

Graf 5:



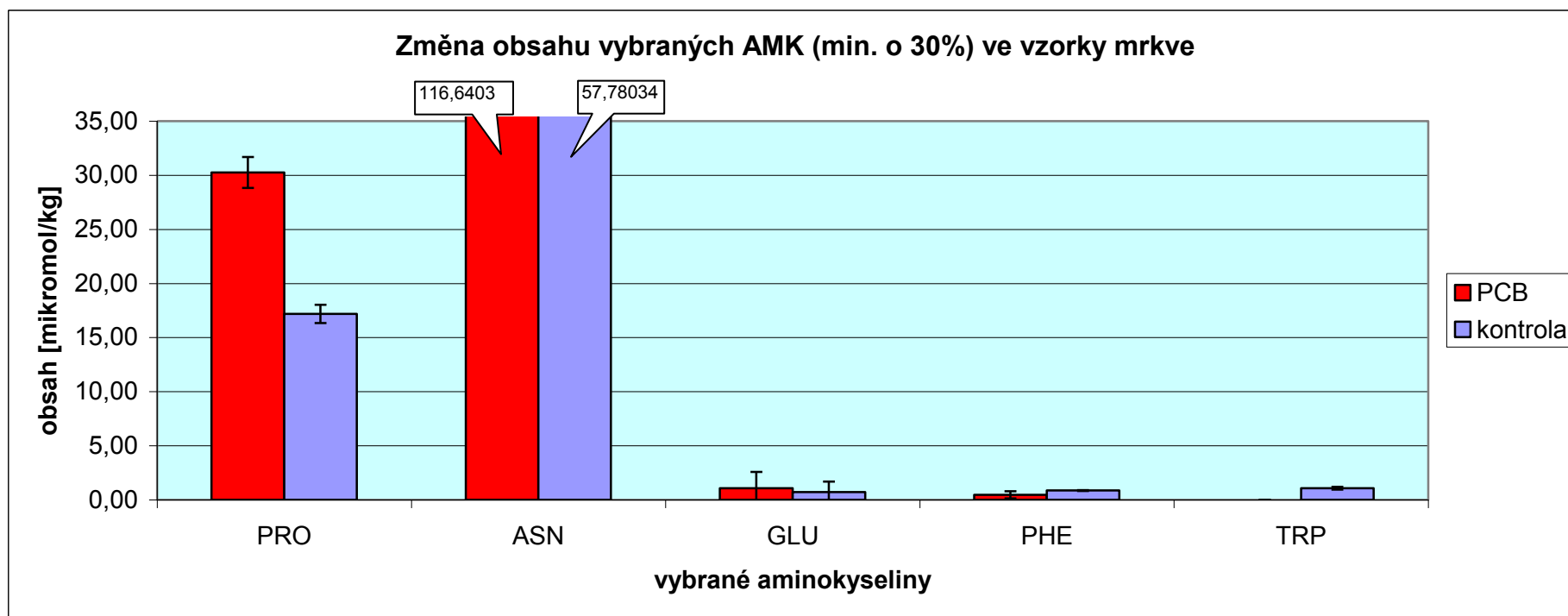
U vzorku petržele došlo k nárůstu glycinu o 32,7 % a kyseliny glutamové o 157 % oproti kontrolnímu vzorku, kdežto u threoninu došlo k poklesu o 55,5 % oproti kontrolnímu vzorku.

Graf 6:



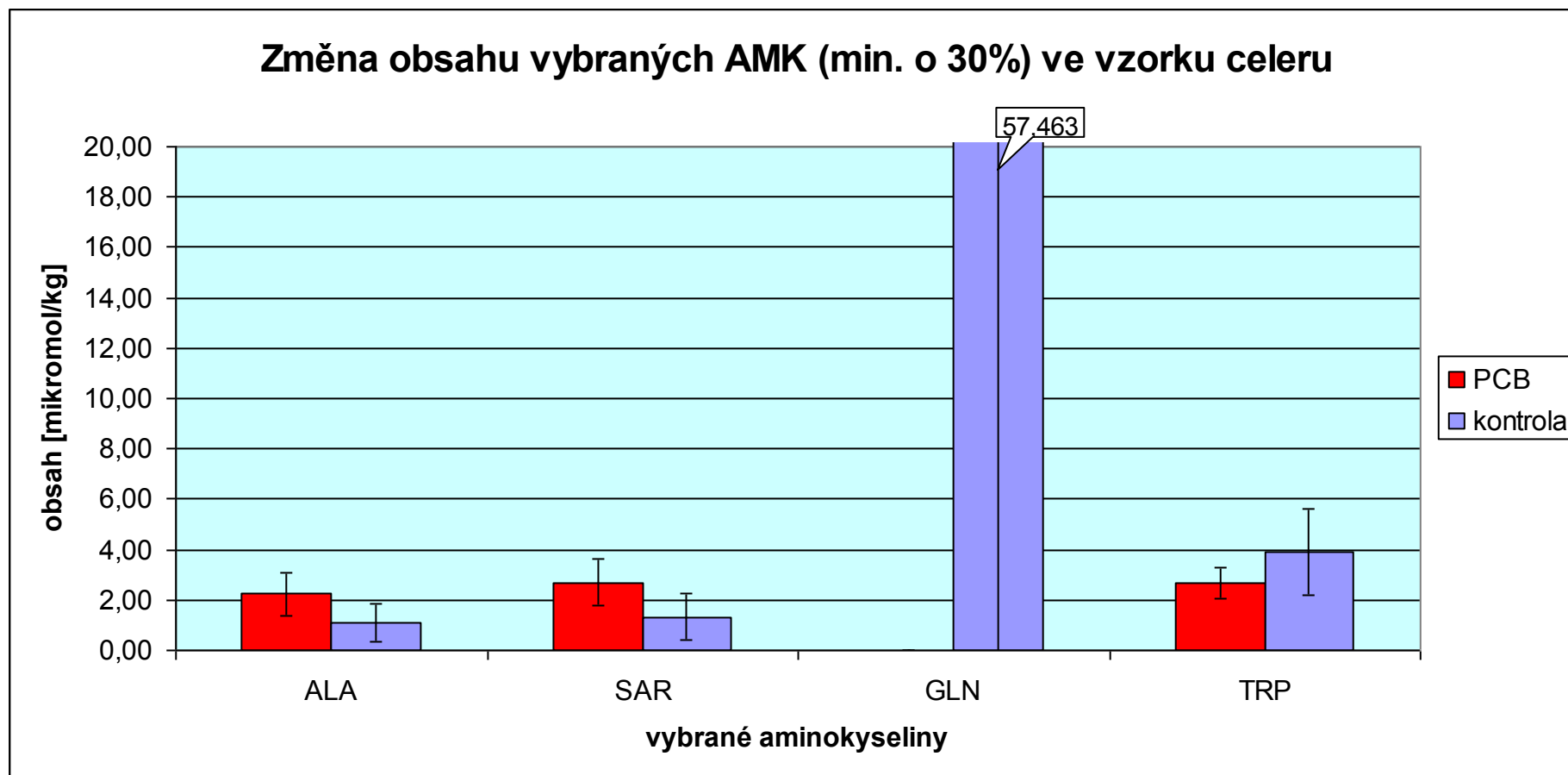
U vzorku mrkve převažuje výrazný pokles vybraných aminokyselin u vzorku pěstovaných na půdě s obsahem PCB oproti kontrolním vzorkům, a to u fenylalaninu o 45,3 % a tryptofanu o 100 %. Ke zvýšení obsahu aminokyselin oproti kontrolnímu vzorku došlo u kyselina glutamové, a to o 51,5 %, prolinu o 43,2 %, asparaginu o 50,5 %.

Graf 7:

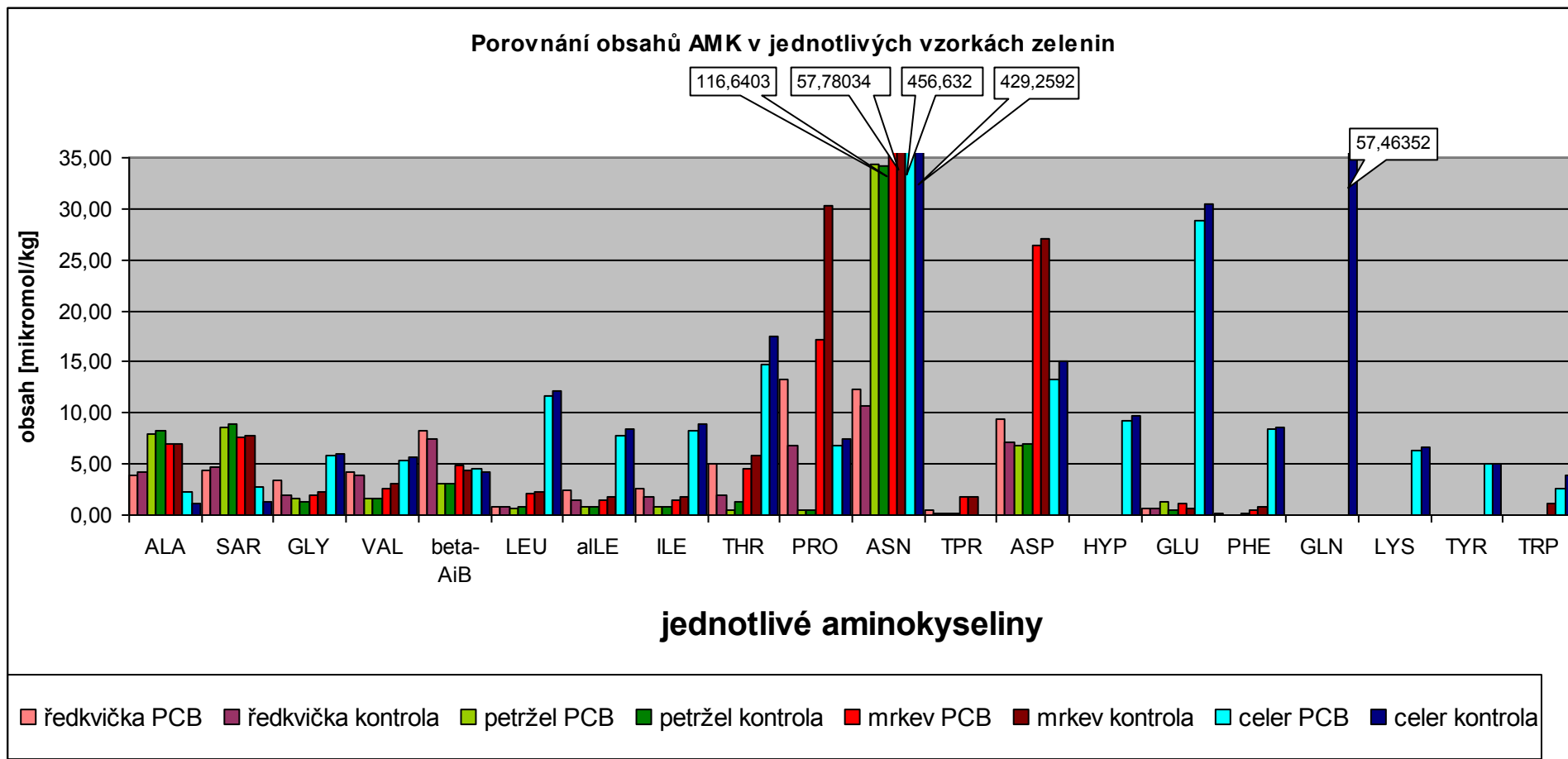


U vzorku celeru došlo ke zvýšení obsahu oproti kontrolnímu vzorku alaninu o 106,7 % a sarkosinu o 102,6 %. K poklesu obsahu aminokyselin oproti kontrolnímu vzorku došlo u glutaminu o 100 % a tryptofanu o 32,5 %.

Graf 8:



Graf 9:

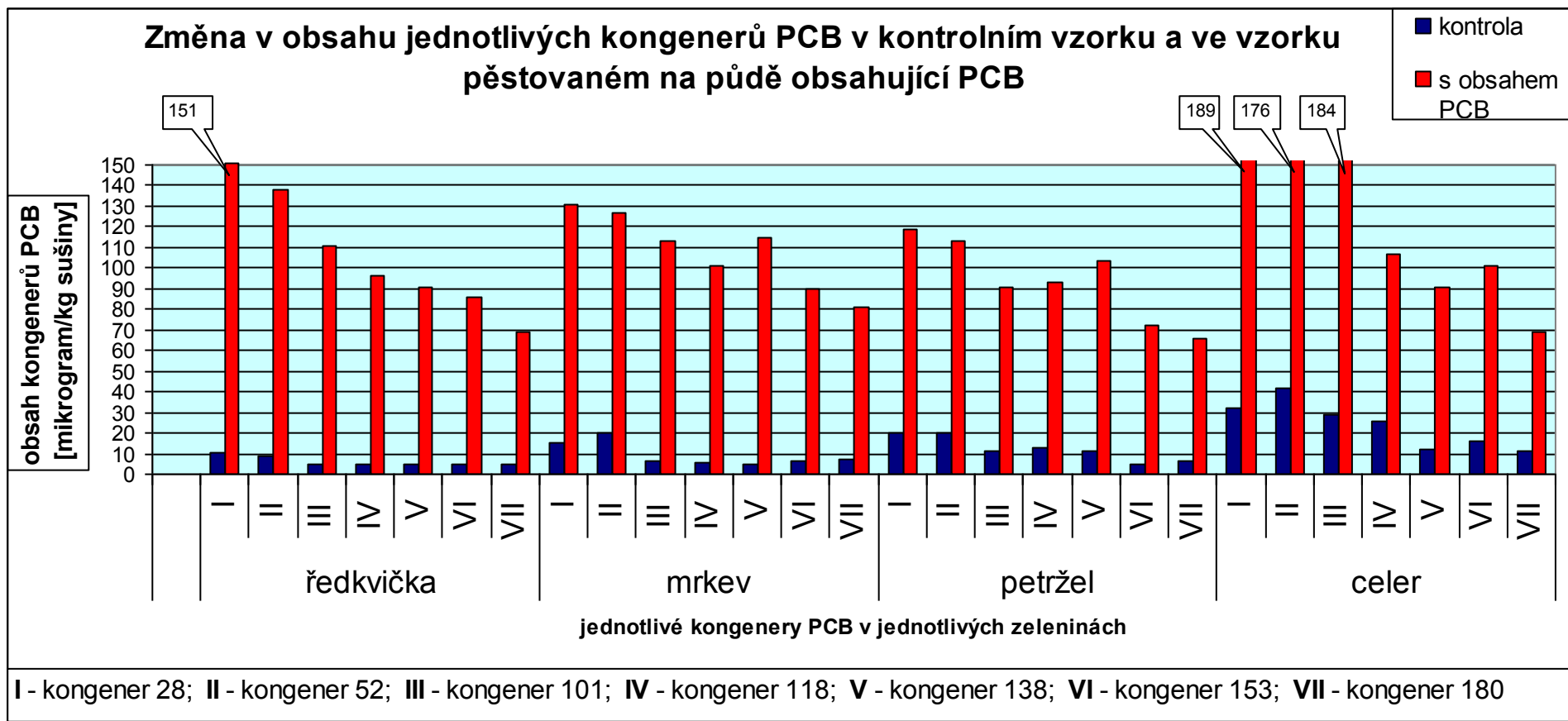


V tomto pokusu byly též stanoveny obsahy jednotlivých kongenerů PCB v jednotlivých zeleninách, a to jak ve vzorcích s obsahem PCB, tak i v kontrolních. Naměřené hodnoty jsou v následující tabulce.

Tabulka 7:

Obsah PCB v jednotlivých zeleninách			
zelenina	kongenery PCB	kontrola	s obsahem PCB
			($\mu\text{g/kg}$ sušiny)
ředkvička	28	10,1	151
	52	8,6	138
	101	5	111
	118	5	96
	138	5	91
	153	5	86
	180	5	69
	suma	43,7	742
mrkev	28	15,1	131
	52	19,9	127
	101	6,3	113
	118	5,8	101
	138	5	115
	153	6,8	90
	180	7,2	81
	suma	66,1	758
petržel	28	20	119
	52	19,8	113
	101	11,5	90,4
	118	12,8	93,3
	138	11,3	103,7
	153	5,1	71,8
	180	6,7	65,7
	suma	87,2	656,9
celer	28	31,8	189
	52	41,5	176
	101	28,7	184
	118	25,9	107
	138	12,3	91
	153	16,4	101
	180	11,3	69
	suma	167,9	917

Graf 10:



5. Diskuze

Změny v obsahu jednotlivých aminokyselin se u všech zelenin poměrně lišily. Tento fakt může být způsoben působením mnoha vnějších faktorů na jednotlivé rostliny. Také pěstování rostlin ve stresových podmínkách způsobených kontaminací půdy PCB může mít za následek nerovnoměrný růst jednotlivých rostlin, jak v rámci jednoho rostlinného druhu, tak mezi druhy zelenin navzájem. Tyto stresující podmínky se pak mohou projevit na množství vypěstované a sklizené biomasy, a to jak nadzemních částí, tak i kořenů. Tento fakt pak samozřejmě způsobí rozdílný obsah jednotlivých aminokyselin, které se například uplatňují při růstu.

Značné množství zkoumaných aminokyselin patří mezi esenciální aminokyseliny, jejichž obsah je v rostlině velmi malý a také značně pohyblivý, což se na výsledných hodnotách také mohlo projevit. Ve vyhodnocení výsledků pokusu jsou diskutovány hlavní aminokyseliny, jejichž změna obsahu v rostlinách při stresujících podmínkách již byla prozkoumána a objasněna a je evidentní.

5.1. Ředkvička

Ve vzorku kontaminované ředkvičky se zvýšily hodnoty aminokyselin oproti kontrolnímu vzorku u glycinu o 72,5 %, dále a-isoleucinu o 58,7 %, isoleucinu o 46 %, threoninu až o 148 %, tryptofanu až o 213,3 %, prolinu o 92,7 % a kyselině asparagové o 30,7 %. Prolin je aminokyselina, jejíž obsah je zvyšuje při poměrně velkém množství různých druhů stresů. Kontaminace půdy PCB na niž byly rostliny pěstovány zapříčinila výrazný stres pro rostliny a obsah prolinu se podle očekávání zvýšil. Podobně jako v mém experimentu Sharma a Dietze (2006) prokázali zvýšenou hladinu prolinu spojenou s různými formami stresu, jako např. se zasolením nebo nízkou či vysokou teplotou. Zvýšená akumulace prolinu byla také pozorována v ječmenu jarním (*Hordeum districhum* L.) a pšenici seté (*Triticum aestivum* L.) po stresu chladem, v pokusu provedeném Hjorthem et al. (2006). Kyselina asparagová se podílí spolu s asparaginem a glutaminem na metabolismu dusíku. Její zvýšení mohlo zapříčinit ovlivnění metabolismu dusíku abiotickým stresem v podobě působení PCB. V pokusu provedeném Mališovou (2008) se prokázal také zvýšený obsah kyseliny asparagové, asparaginu, kyseliny glutamové a glutaminu ve vrbách jako odezva na stres způsobený těžkými kovy. K podobným závěrům došli i Stazsková a Táborský (2005). Aminokyseliny threonin a isoleucin spolu v rostlinách úzce souvisí. Threonin je jednou ze složek tvořící substrát pro syntézu isoleucinu. Zejména akumulace

aminokyselin s dlouhým řetězcem, jako např. leucinu, je během osmotického stresu vyvolávána mnohokrát. Takovéto aminokyseliny jsou důležitými prekursory pro různé sekundární metabolity. Akumulace isoleucinu bývá vyvolána osmotickým stresem. Přítomnost PCB v rostlině se na tomto projevu stresu může jistě také podílet. Zvýšení obsah glycinu, stejně jako u následující petržele může být způsobeno obecnou odezvou rostliny na působící stresor v podobě PCB.

5.2. Petržel

U vzorku petržele došlo k nárůstu glycinu o 32,7 % a kyseliny glutamové o 157 % oproti kontrolnímu vzorku, kdežto u threoninu došlo k poklesu o 55,5 % oproti kontrolnímu vzorku. Kyselina glutamová je považována za prekurzor biosyntézy neesenciálních aminokyselin glutaminu a prolinu, proto se zvýšení jejího obsahu dá přisuzovat počínající tvorbě prolinu i glutaminu vlivem stresu způsobeného PCB. Dle Younis et al. (2008) se vlivem stresu zasolením či osmotické stresu zvýšil obsah mimo jiné i kyseliny glutamové, glycinu a prolinu. Glycin je aminokyselina, jejíž obsah v rostlině se zvýší působením stresu, a to hlavně zasolením. Jelikož průběh stresové reakce je obecně u všech stresů rostlin stejný, lze předpokládat zvýšení glycinu jako reakce na působení stresu i PCB. V potaz můžeme brát také citlivost rostlin na obsah živin v půdě, který na obsahem glycinu v rostlině (potažmo v jednotlivých druzích zelenin) může mít také vliv.

5.3. Mrkev

U vzorku mrkve převažuje výrazný pokles vybraných aminokyselin u vzorku pěstovaných na půdě s obsahem PCB oproti kontrolním vzorkům, a to u fenylalaninu o 45,3 % a tryptofanu o 100 %. Ke zvýšení obsahu aminokyselin oproti kontrolnímu vzorku došlo u kyseliny glutamové, a to o 51,5 %, prolinu o 43,2 %, asparaginu o 50,5 %. Obdobně jako u vzorku ředkvičky, může být zvýšený obsah prolinu způsoben stresem rostliny vyvolaným pěstováním na půdě kontaminované PCB. Zvýšení obsahu prolinu může vyvolat mnoho biotických i abiotických stresorů, jako např. chlad, mraz, vysoká teplota, sucho, zasolení, těžké kovy či napadení patogenem. Jeho zvýšení tedy mohlo být způsobeno i změnou venkovních teplot při pěstování ve venkovních vegetačních halách těsně před sklizní. Asparagin je aminokyselina zvyšující odolnost rostliny vůči chladu a mrazu. Podílí se také na metabolismu dusíku, který následkem působení stresu může být značně ovlivněn. Asparagin také hraje významnou roli při klíčení, částečně i při přirozeném stárnutí rostliny. V různých pokusech byla prokázána výrazně vyšší syntéza asparaginu po sklizni rostlin. V experimentu

provedeném Hjorthem et al. (2006) byl obsah glutaminu a asparaginu v metličce křivolaké zvýšen vysokým obsahem dusíku. Zvýšení argininu může znamenat jednak ovlivnění metabolismu dusíku vlivem působení PCB na rostlinu, či jeho zvýšení při procesu přirozeného stárnutí rostliny. Jak jsem již uvedla, je kyselina glutamová prekurzorem při syntéze prolinu a glutaminu, proto její zvýšený obsah přisuzuji právě zvýšenému obsahu prolinu.

5.4. Celer

U vzorku celeru došlo ke zvýšení obsahu oproti kontrolnímu vzorku alaninu o 106,7 % a sarkosinu o 102,6 %. K poklesu obsahu aminokyselin oproti kontrolnímu vzorku došlo u glutaminu o 100 % a tryptofanu o 32,5 %. Glutamin je další z aminokyselin podílející se na metabolismu dusíku. Stejně jako v předchozích případech zelenin může být změna v jeho obsahu způsobena ovlivněním metabolismu dusíku vyvolaným stresem rostliny polychlorovanými bifenoly. Jednotlivé duhy zelenin mohou být také různě citlivé na obsah dusíku v půdě. Změna obsahu alaninu v rostlinách byla prokázána při působení stresu rostlině zasolením a při anaerobním stresu. Reakce rostlin na stres je založena na obecných pravidlech, proto usuzuji zvýšení obsahu alaninu stresové reakci způsobené působením PCB či případným ovlivněním anaerobního metabolismu uhlíku způsobeným právě přítomností PCB v rostlině.

Z výsledků celkového obsahu kongenerů PCB absorbovaných jednotlivými zeleninami vyplývá, že se obsah celkové sumy kongenerů PCB (kongenery 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180) zvýšil, a to u ředkvičky o 698,3 µg/kg sušiny (17 x), u mrkve o 691,9 µg/kg sušiny (11,5 x), u petržele o 569,7 µg/kg sušiny (7,5 x) a u celeru o 749,1 µg/kg sušiny (5,5 x). Největší absorpce a akumulace sumy kongenerů PCB se tedy prokázala u ředkvičky. V pokusu provedeném Javorskou a kol. (2005) byla stanovena celková suma sedmi stejných kongenerů PCB jako v mém pokusu. Z hodnocení fytořediačních schopností mrkve, vrby a kostřavy vyplynulo, že největší obsah sumy všech jednotlivých kongenerů byl stanoven v mrkvi. Stejně jako u Chekola et al. (2004) byla prozkoumána absorpce PCB do kukuřice, kapusty a mrkve a mrkev obsahovala největší koncentraci PCB ze sledovaných plodin. Vzhledem k porovnávání různých rostlinných druhů, vychází nejvyšší koncentrace PCB u mrkve. V mém pokusu je obsah PCB u mrkve podobně vysoký, jako u ředkvičky. I když je nepatrně vyšší obsah PCB u ředkvičky, výsledky hodnot PCB u mrkve se shodují s výsledky pokusů jiných autorů.

Co se týká jednotlivých kongenerů PCB, největší absorpce byla prokázána u kongeneru č. 28 (zejména u ředkvičky a celeru), dále pak u kongeneru č. 52 (také u ředkvičky a celeru), nejmenší absorpce byla u kongeneru č. 180, a to u všech sledovaných zelenin.

6. Závěr

Ve všech vzorcích zelenin pěstovaných na půdě kontaminované polychlorovanými bifenyly se změnila obsahy aminokyselin. Zvýšení obsahů řady esenciálních aminokyselin můžeme přisuzovat jak působení stresu vlivem příjmu polychlorovaných bifenyly rostlinami, tak i růstu jednotlivých rostlinných jedinců. Esenciální aminokyseliny jsou důležité při stavbě rostlinného těla, jejich obsahy mohou být značně rozkolísané jak mezi jednotlivými rostlinnými druhy, tak i mezi jednotlivými jedinci v rámci jednoho druhu. Přisuzovat proto zvýšení jednotlivých esenciálních aminokyselin působení stresu by podle mého názoru nebylo objektivním hodnocením a ze svých výsledků bych tento fakt ani nemohla prokázat.

Prokazatelné výsledky působení stresu vlivem příjmu polychlorovaných bifenyly se prokázaly u volných aminokyselin, jejichž změny obsahu v různých rostlinných druzích již byly v řadě odborných pokusů prokázány a jsou evidentní. Mezi takové aminokyseliny patří například prolin, asparagin, kyselina asparagová, glutamin a kyselina glutamová.

Ohledně výsledků absorpce jednotlivých kongenerů polychlorovaných bifenyly do jednotlivých druhů zelenin, nejlepší schopnost absorpce projevila ředkvička (zvýšení celkové obsahu kongeneru PCB 17-krát), dále pak mrkev (zvýšení 11,5-krát). Petržel a celer absorbovali celkovou sumu kongenerů PCB zhruba 2-krát až 3-krát méně. Ohledně jednotlivých kongenerů PCB, nejvíce absorbovaným kongenerem byl kongener č. 28 (zejména u ředkvičky a celeru), dále pak kongener č. 52 (také u ředkvičky a celeru), nejméně absorbovaným kongenerem byl kongener č. 180, a to u všech sledovaných zelenin.

Výsledky mého experimentu se obecně shodovaly s výsledky dalších studií této problematiky.

7. Literární zdroje

- Amir, R.; (2010). Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. *Amino Acid*. DOI 10.1007/s00726-010-0482-x
- EPA; (2000). Introduction to Phytoremediation. National Risk Management Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268
- Campanella B., Bock C., Schroeder P. (2001). Phytoremediation to increase the degradation of PCBs and PCDD/Fs. *Environ.Sci & Pollut. Res. (Online First)*:1-13
- Frýdlová, Z.; Wilhelmová, N.; Havlová, M.; Vaňková, R.; (2007). Aktivita antioxidantních enzymů v rostlinách tabáku se zvýšenou hladinou prolinu stresovaných suchem a teplotním šokem. *Chemické Listy* 101. 425 – 465
- Herrera-Rodríguez, M. B.; Maldonado, J. M.; Pérez-Vicente, R.; (2006). Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. *Journal of Plant Physiology* 163. 1061 – 1070
- Hjorth, M.; Mathiassen, S. K.; Kudsk, P.; Ravn, H. W.; (2006). Amino acids in loose silky-bent (*Apera spica-venti* (L.) Vesuv.) responding to prosulfocarb exposure and the correlation with physiological effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86. 138 - 145
- Holubec, V.; (2005). Stres a adaptace rostlin k vysoké koncentraci solí. Vliv biotických a abiotických stresorů na vlastnosti rostlin – sborník. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha - Ruzyně. 354 - 359
- Chekol, T.; Vough, L. R.; Chaney, R. L. (2004). Phytoremediation of polychlorinated biphenyl – contaminated soils: the rhizosphere effect. *Environment International* 30: 799 – 804
- Javorská, H.; Tlustoš, P.; Pavlíková, D.; Najmanová, J.; (2005). Využití rostlin k remediaci půdy kontaminované polychlorovanými bifenyly. Racionální použití hnojiv – sborník konference konané na České zemědělské univerzitě v Praze 1.12.2005. Praha: 115 – 118
- Joshi, V.; Jung, J.; Fei, Z.; Jander, G.; (2010). Independence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids*. DOI 10.1007/s00726-010-0505-7

- Kacálková, L.; Tlustoš, P.; (2008). Příjem polychlorovaných bifenylyů vybranými rostlinami. Východočeský sborník přírodovědný – Práce a studie, č. 15: 25 - 30
- Kopřiva, S.; Mugford, S. G.; Matthewman, C.; Kopřivová, A.; (2009). Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Reports*, vol. 28, 1769 - 1780
- Kučerová, P.; Macková, M.; Macek, T.; (1997). Perspektivy fytořemediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chemické listy* 93, 19 - 26
- Macek, T.; Macková, M.; Káš, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18: 23 – 34
- Macek, T.; Macková M.; Kučerová, P.; Chroma, L.; Burkhard, J.; Demnerová, K. (2002). Phytoremediation. *Biotechnology for the Environment: Soil Remediation*. Kluwer Academic Publisher: 115 – 137
- Macková, M.; Macek, T.; Otčenášková, J.; Burkhard, J.; Demnerová, K.; Pazlarová, J.; (1997). Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls by Plant Cells. *International Biodeterioration & Biodeterioration*, vol. 39, No. 4; 317 – 325
- Macková, M.; Macek, T.; (2005). Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí. Vědecký výbor a fytořanitární a životní prostředí. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. (www.phytopsanitary.org)
- Mališová, K.; Mestek, O.; Speciační analýza stopových prvků v listech vrby. (2009). *Chemické listy* 103, 180 – 184
- Mikošková, J.; Čáp, L.; Lemr, K.; (2004). Postupy izolace polyaromatických uhlovodíků a polychlorovaných bifenylyů při jejich stanovení. *Chemické Listy* 98, 80 – 85
- Piterková, J.; Tománková, K.; Luhová, L.; Petřivalský, M.; Peč, P.; (2005). Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické Listy* 99, 455 - 466
- Procházka S.; Macháčková, I.; Krekule, J.; Šebánek J. a kol. (1998). Fyziologie rostlin. *Academia Praha*. Praha: 412 – 414 (421)
- Ohtsubo, Y.; Kudo, T.; Tsuda, M.; Nagata, Y.; (2004). Strategie for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology Biotechnology* 65: 250 - 258

- Sharma S. S.; Dietz, K. J.; (2006). The significance of amino acid-derived molecules in plant response and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, vol. 57, No. 4: 711 - 726
- Schnoor, J. L.; (2002). *Phytoremediation of Soil and Ground-water*. GWRT Series, E – Series: TE-02-01. 1 - 45
- Singh, A.; Ward, O. P. (eds.) (2004). *Applied Bioremediation and Phytoremediation*. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, 281 s.
- Staszková, L.; Táborský, J.; (2005). Vliv chladového stresu na metabolismus prolinu pšenice. Vliv biotických a abiotických stresorů na vlastnosti rostlin – sborník. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha - Ruzyně. 287 – 289.
- Šmidrkal, J.; Filip, V.; Melzoch, K.; Hanzlíková, I.; Buckiová, D.; Kříša, B.; (2001). Resveratrol. *Chemické listy* 95, 602 – 609.
- Tlustoš, P.; Száková, J.; Fischerová, Z.; Sochorová, K. (2004). *Remediace půd. Racionální použití hnojiv – sborník konference konané na České zemědělské univerzitě v Praze 25.11.2004*. Praha: 69 – 78
- Tlustoš, P.; Pavlíková, D.; Balík, J.; (2006). Mechanismus příjmu rizikových prvků rostlinami a jejich hromadění v biomase. *Česká zemědělská univerzita v Praze*: 21 - 27
- Totevová S.; Prouza, M.; Brenner, V.; Demnerová K. (1997). Bakteriální degradace PCB. *Chemické Listy* 91, 858 - 866
- Horák, J.; (2002). Dioxiny jako zdroj ohrožení životního prostředí a zdraví. *Chemické Listy* 96, 863 – 868
- Ushakova, S. A.; Kovaleva, N. P.; Tikhomirova, N. A.; Gribovskaya, I. V.; Kolmanova, A. A.; (2006). Effect of Photosynthetically Active Radiation, Salinization, and Type of Nitrogen Nutrition on Growth of *Salicornia europaea* Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 53, No. 6: 785 - 792
- Vácha, R. (2004). *Organické polutanty v půdách ČR. Racionální použití hnojiv – sborník konference konané na České zemědělské univerzitě v Praze 25.11.2004*. Praha: 48-54
- Vašáková, L.; Vomastková, M.; (1992). Význam prolinu pro produkci rostlin. *Vysoká škola zemědělská Praha*: 1 - 5
- Voet, D.; Voetová, J.G.; (1990). *Biochemie*. Victoria publishing Praha: 61 – 64

- Younis, M. E.; Hasaneen, M. N. A.; Kazamel, A. M. S.; (2008). Plant grown, metabolism and adaptation in relation to stress conditions. XXVII. Can ascorbic acid jodidy the averse effects of NaCl and mannitol on amino acids, nucleic acids and protein patterns in *Vicia faba* seedlings? Protoplasma, vol. 325, 37 - 47
- Zeeb, B. A.; Amphlett, J. S.; (2006). Potential for phytoremediation of polychlorinated biphenyl-(PCB)-contaminated soil. International Journal of Phytoremediation, vol. 8, 199 - 221
- Zehnálek, J.; Adam, V.; Kizek, R.; (2006). Asimilace dusičnanového, amonného a anodického dusíku u zemědělských plodin. Chemické listy 100, 508 – 514
- Zehnálek, J.; Petřek, J.; Petrlová, J.; Adam, V.; Víteček, J.; Kizek, R.; Havel, L.; (2005). Vliv biotických a abiotických stresorů na vlastnosti rostlin – sborník. Využití rostlin ve fytoremediačních technologiích. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha - Ruzyně. 337 – 340.

- **internetové prameny:**

- zdroj č.1:

www.recetox.muni/projekty/unido/narodni_inventura_pops.htm

- zdroj č. 2:

<http://vydavatelstvi.vscht.cz/>

- zdroj č. 3:

www.irz.cz/latky/polychlorovane_bifen

- zdroj č. 4:

www.recetox.muni.cz/sources/unido_narodni_inventura_03/POPsINV_cast_VII_Kapitola_1_4_Technologie.pdf>

- zdroj č. 5:

<http://www.phenomenex.com/products/brands/view.aspx?id=178>

- zdroj č. 6

<http://www.phenomenex.com/products/brands/view2.aspx?id=9081>