

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA APLIKOVANÉ EKOLOGIE

STANOVENÍ OBSAHU FENOLICKÝCH LÁTEK
V BIOMASE MOKŘADNÍCH ROSTLIN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Ing. Tereza Dvořáková Březinová, Ph.D.

Diplomant: Bc. Hana Rottová

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Hana Rottová

Regionální environmentální správa

Název práce

Stanovení obsahu fenolických látek v biomase mokřadních rostlin

Název anglicky

Evaluation of phenolics content in the biomass of wetland macrophytes

Cíle práce

Porovnat obsah fenolických látek v různých druzích mokřadních rostlin.

Porovnat obsah těchto látek v mokřadních rostlinách vyskytujících se na různých mokřadních lokalitách.

Metodika

V rámci řešení diplomové práce bude probíhat sběr rostlinného materiálu, který bude analyzován za účelem stanovení fenolických látek. Bude odebírána nadzemní biomasa sedmi mokřadních rostlin, které se v našich podmínkách běžně vyskytují. Vzorčky rostlin budou sklizeny ze tří rozdílných lokalit s vhodným porostem dnaých rostlin (např. niva, kořenová čistírna odpadních vod, mokrá louka).

Doporučený rozsah práce

60 stran včetně příloh

Klíčová slova

fenolické látky, mokřady, makrofyta

Doporučené zdroje informací

- Bravo, L., 1998: Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews, Vol. 56, pp. 317 – 333.
- Harrison, M. M., Tyler, A., Ch., Hellquist, C. E., Pagano, T., 20017: Phenolic content of invasive and non-invasive emergent wetland plants. Aquatic Botany, Vol. 136, pp. 146-154.
- Rejmánková, E., 2015: Phenolic content and growth of wetland macrophytes: is the allocation to secondary compounds driven by nutrient availability? Folia Geobot., <http://dx.doi.org/10.1007/s12224-015-9227-7> .

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Tereza Dvořáková Březinová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra aplikované ekologie

Konzultant

prof. Ing. Jan Vymazal, CSc.

Elektronicky schváleno dne 21. 12. 2016

prof. Ing. Jan Vymazal, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 23. 2. 2017

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 12. 03. 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Terezy Dvořákové Březinové, Ph.D., a že jsem v seznamu uvedla všechny literární prameny.

V Praze dne 1. 4. 2017

Bc. Hana Rottová

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala své vedoucí práce paní Ing. Tereze Dvořákové Březinové, Ph.D., která mi poskytla při zpracování mé práce cenné rady a odborné vedení a také za její trpělivost.

Abstrakt:

Tato diplomová práce sleduje obsah fenolických látek ve vybraných druzích mokřadních rostlin na různých mokřadních lokalitách v České republice. Nadzemní biomasa rostlin byla sklizena v průběhu roku 2016 (červen, srpen, říjen a prosinec) ze sedmi výzkumných lokalit (niva, mokrá louka, litorál rybníka), následně sušena a homogenizována. Ve vzorcích biomasy byly pomocí spektrofotometrické metody Folin - Ciocalteu stanoveny koncentrace fenolických látek.

Ze získaných výsledků vyplývá, že koncentrace fenolických látek se liší v závislosti na druhu a části rostliny, lokalitě i datu odběru biomasy.

Poznatky získané z této práce přispějí k rozšíření problematiky, která je v současnosti dosti opomíjena, přestože porozumění funkce fenolických látek v mokřadních ekosystémech může přispět k rozšíření znalostí o mechanismech dekompozice v mokřadu a zvýšenému ukládání uhlíku.

Klíčová slova: fenolické látky, mokřady, makrofyta

Abstract:

This diploma thesis deals with the topic of presence of phenolic compounds in selected species of wetland plants that are found in different wetlands in the Czech Republic. Above-ground biomass of plants were harvested during 2016 (June, August, October and December) from seven different research areas (meadow, wet meadow, pond littoral zone) then dried and homogenised. Using the method Folin – Ciocalteu the concentration of phenolics was determined in various biomass samples.

The outcome of this research shows that the concentration of phenolic substances vary depending on the plant species and parts, area and the date of the harvesting.

Findings of this research will contribute to extension of knowledge of this issue with regard to the rate of decomposition and depositing of carbon.

Key words: Phenolic compounds, wetland, macrophytes

Obsah:

Úvod	10
I Literární rešerše	11
1 Mokřady	11
1.1 Definice mokřadů	11
1.2 Vybrané funkce mokřadů.....	12
1.3 Vlastnosti mokřadních půd	14
1.4 Koloběh uhlíku v mokřadech.....	15
1.5 Dekompozice v mokřadech.....	17
2 Mokřadní rostliny	18
2.1 Rákos obecný - <i>Phragmites australis</i>	19
2.2 Chrastice rákosovitá - <i>Phalaris arundinacea</i>	20
2.3 Ostřice obecná - <i>Carex nigra</i>	21
2.4 Orobinec širokolistý - <i>Typha latifolia</i>	22
2.5 Skřípina lesní - <i>Scirpus sylvaticus</i>	23
2.6 Zblochan vodní - <i>Glyceria maxima</i>	24
2.7 Sítina rozkladitá - <i>Juncus effusus</i>	25
3 Fenolické látky	26
3.1 Fenolové kyseliny a flavonoidy	29
3.2 Fenolické látky v rostlinách	30
4 Analytické metody stanovení fenolických látek v rostlinách.....	32
4.1 Extrakční metody	32
4.2 Kvantifikace fenolických látek	32
4.2.1 Spektrometrická analýza.....	33
4.2.2 Plynová chromatografie.....	34
4.2.3 Vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC)	34
5 Cíle práce.....	35

II	Metodika.....	36
6	Výzkumné lokality a sběr vzorků.....	36
6.1	Výzkumné lokality.....	36
6.2	Sběr nadzemní biomasy	37
7	Materiálové a přístrojové vybavení	39
7.1	Přístroje a zařízení	39
7.2	Chemikálie	39
8	Analytická metoda.....	39
9	Zpracování a statistické vyhodnocení výsledků	41
9.1	Zpracování výsledků.....	41
9.2	Statistické vyhodnocení výsledků.....	42
III	Výsledky práce	43
10	Výsledky.....	43
10.1	Koncentrace celkových fenolických látek v mokřadních rostlinách na různých lokalitách	43
10.2	Sezónní dynamika koncentrace celkových fenolických látek.....	48
10.3	Celkové fenolické látky v sedmi mokřadních rostlinách	50
11	Diskuze	51
12	Závěr.....	54
	Seznam použité literatury:	55
	Seznam tabulek a obrázků	61

Úvod

Fenolické látky představují nejširší skupinu sekundárních metabolitů rostlin, které mají v rostlinách různé funkce.

Tyto látky především zvyšují obranyschopnost rostlin, díky čemuž mohou rostliny lépe reagovat na změny klimatických podmínek. Fenoly nemají pouze pozitivní dopad na rostliny, ale vliv jejich antioxidačních účinků byl prokázán i na lidské zdraví (Bravo, 1998). Konzumací potravin se zvýšenou hladinou fenolických látek lze snížit riziko výskytu mnoha chorob, a proto, se v posledních letech těší tato problematika velkému zájmu (Giada, 2013).

Jednou z obraných schopností rostlin, která je zprostředkována pomocí fenolických látek, je horší stravitelnost biomasy pro živočichy i mikroorganismy. To vede k pomalejšímu rozkladu biomasy, což je důležitý jev především v mokřadních ekosystémech, neboť pomalá dekompozice mokřadní biomasy vede ke zvýšenému ukládání uhlíku (Hättenschwiler et Vitousek, 2000). Bylo prokázáno, že mokřadní ekosystémy jsou díky tomuto jevu považovány za nejdůležitější ekosystémy s přirozenými zdroji uhlíku na světě. Bylo rovněž popsáno, že čím vyšší je obsah fenolických látek v mokřadních rostlinách, tím pomalejší je jejich dekompozice (Snyder et Rejmánková, 2015).

Obsahem fenolických látek v mokřadních rostlinách se zabývá studie Rejmánkové (2015), která měřila obsah fenolů v biomase mokřadních rostlin v závislosti na množství živin v umělých a přírodních podmínkách. Bylo prokázáno, že při limitaci živin je ovlivněno množství fenolických látek v rostlině.

Harrison (2017) sledoval obsah fenolických látek v 19 druzích mokřadních rostlin. Výsledky byly velice proměnlivé vzhledem k podmínkám místa odběru, množství živin v mokřadu a skupinám živočichů žijících se prakticky jen rostlinami nebo jejich částmi.

Obě tyto studie prokázaly závislost množství fenolických látek v rostlinách na množství živin v mokřadu. Studie byly provedeny v podmínkách amerického kontinentu, převážně ve slané vodě. Na druhou stranu, práce sledující obsah fenolických látek v našich či obecně v evropských podmínkách v současnosti úplně chybí. Cílem této práce bylo tedy rozšířit danou problematiku a stanovit koncentrace fenolických látek ve vybraných druzích mokřadních rostlin na různých mokřadních lokalitách v České republice.

I Literární rešerše

1 Mokřady

1.1 Definice mokřadů

S mokřady se setkáváme téměř na celém světě na všech kontinentech mimo Antarktidu, kde nejsou vhodné klimatické podmínky pro tento ekosystém. V období karbonu to byly právě mokřady, díky kterým dnes můžeme využívat fosilní paliva. Mokřady se řadí mezi přechodné přírodní ekosystémy, protože se nacházejí na rozhraní suché země a vodního prostředí. Jedná se o přechod ze souše do vodního ekosystému, který je velice pozvolný. Mokřady jsou velmi proměnlivé ekosystémy a jejich dynamika je přímo závislá na množství vodní hladiny a tudíž je velmi složité vytvořit přesnou definici tohoto přírodního a nepostradatelného ekosystému pro život na zemi (Vymazal, 1995).

Mitsch a Gosselink (2000) definovali mokřad dle následujících ukazatelů. Voda je v mokřadech po většinu roku, jen se může měnit její množství. Mokřady se vyskytují i na březích rybníků na hranici pevninského ekosystému a hluboké vody, kde se oba ekosystémy prolínají. Jejich rozloha je různá dle umístění v krajině a ekologické podmínky závisí na míře zásahu člověka a to v návaznosti na zemědělskou, industriální nebo urbanizovanou krajinu.

V České republice k mokřadům řadíme:

- Rybníky a břehová pásma
- Mokrý louky a prameniště
- Říční nivy včetně lužních lesů
- Rašeliniště, slatiniště
- Podmáčené smrčiny
- Umělé mokřady (kořenové čistírny odpadních vod) (Pokorný, 2004)

Samotné slovo mokřad vzniklo z anglického slova wetland čili mokrá země. Mokřady jsou důležitou součástí krajiny, nejen že zadržují vodu, ale jsou také útočištěm mnoha druhů živočichů a rostlin. Díky tomu zvyšují biodiverzitu v krajině, a proto jsou nejen u nás v České republice chráněny legislativně.

Roku 1971 byla v Iránu ve městě Ramsar podepsána Ramsarská úmluva o ochraně mokřadů, které mají mezinárodní význam jako biotopy pro vodní ptactvo. Česká republika se k této úmluvě přidala 2. června roku 1990, čímž se zavázala nejen k ochraně stávajících mokřadů, ale i k budování mokřadů nových, podporování jejich výzkumu, usilování o zvyšování stavů vodního ptactva a k výchově kvalifikovaných pracovníků (Ramsarská úmluva, 1971).

V této úmluvě se mokřadem rozumí území s močály, slatinami, rašeliništi a vodami přirozenými nebo umělými, trvalými nebo dočasnými, stojatými i tekoucími, sladkými, brakickými nebo slanými, včetně území s mořskou vodou, jejíž hloubka při odlivu nepřesahuje 6 metrů (Ramsarská úmluva, 1971).

Do seznamu mokřadů mezinárodního významu na našem území řadíme:

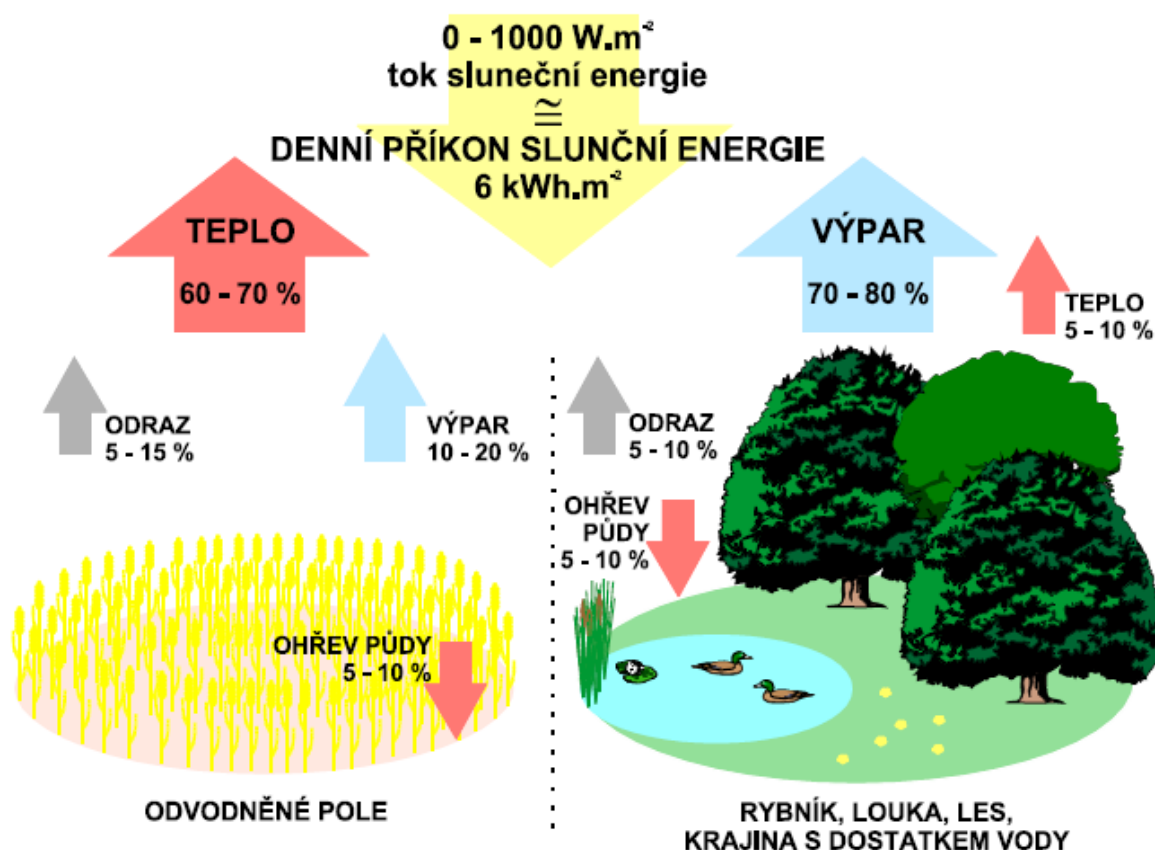
- Šumavská rašeliniště
- Třeboňské rybníky
- Novozámecký a Břehyňský rybník
- Lednické rybníky
- Litovelské Pomoraví
- Poodří
- Krkonošská rašeliniště
- Třeboňská rašeliniště
- Mokřady dolního Podyjí
- Mokřady Liběchovky a Pšovky
- Podzemní Punkva
- Krušnohorská rašeliniště (MŽP, 2017)

1.2 Vybrané funkce mokřadů

Díky velkému množství vody, které je v mokřadních ekosystémech, patří mezi hlavní funkce mokřadů distribuce sluneční energie v krajině. Ze všech půd a vodních ploch se za pomoci sluneční energie vypařují vodní páry, které vznikají výparem vody z půdy (evaporací) a výparem vody z rostlin (transpirací). Spojení těchto dvou výparů se nazývá evapotranspirace (Moore, 2006).

Vodní páry patří mezi nejdůležitější skleníkové plyny v atmosféře. Díky skleníkovým plynům v atmosféře přes den nedochází k nadměrnému ohřevu planety Země a v noci naopak k nadměrnému ochlazení. Kdyby skleníkové plyny v atmosféře nebyly, byly by průměrná teplota Země -18 °C. (Moldan, 2015).

Jak je patrné z obrázku č. 1, při dopadu sluneční energie do krajiny s dostatkem vody se půda ohřívá a vzniká výpar, který krajinu chladí, naopak při dopadu sluneční energie do odvodněné krajiny se energie mění na teplo, které se odráží zpět do atmosféry, okolní krajina se zahřívá a dochází k vysychání a následné ztrátě živin (Eiseltová et Pokorný, 2001).



Obrázek č. 1: Distribuce sluneční energie v odvodněné krajině a v krajině zásobené vodou (URL 1)

Mokřady jsou také významným rezervoárem uhlíku. K hromadění uhlíku v mokřadech napomáhá pomalá dekompozice, která je popsána v kapitole níže (Erwin, 2009). Uhlík je vázán v sedimentech a odstupem času má významnou roli jako zdroj energie. Tyto sedimenty lze využít i v zemědělství (Just, 2003).

Další funkcí mokřadů je retence vody v krajině. Touto zadržanou vodou lze podporovat místní vodní síť v sušších obdobích a naopak tato funkce může významně ovlivnit/zpomalit rozlévání vody do okolní krajiny v období povodní (Just, 2003).

Mokřady rovněž představují velmi významné ekosystémy, ve kterých žije mnoho druhů rostlin a živočichů, kterým mokřad poskytuje dostatek živin a ochranu před

okolními vlivy prostředí a predátory. Nejsou však vhodné k rekreačním účelům, protože v letních měsících jsou typické pro vysoký výskyt komárů (Just, 2003).

1.3 Vlastnosti mokřadních půd

Povahu půdy v mokřadech určuje druh vegetace rostoucí v daném ekosystému, přítomnost živočichů a zaplavování půdy vodou. V půdě probíhá velké množství chemických procesů a také je půda zdrojem živin pro velkou část mokřadních rostlin. Půdy se dělí:

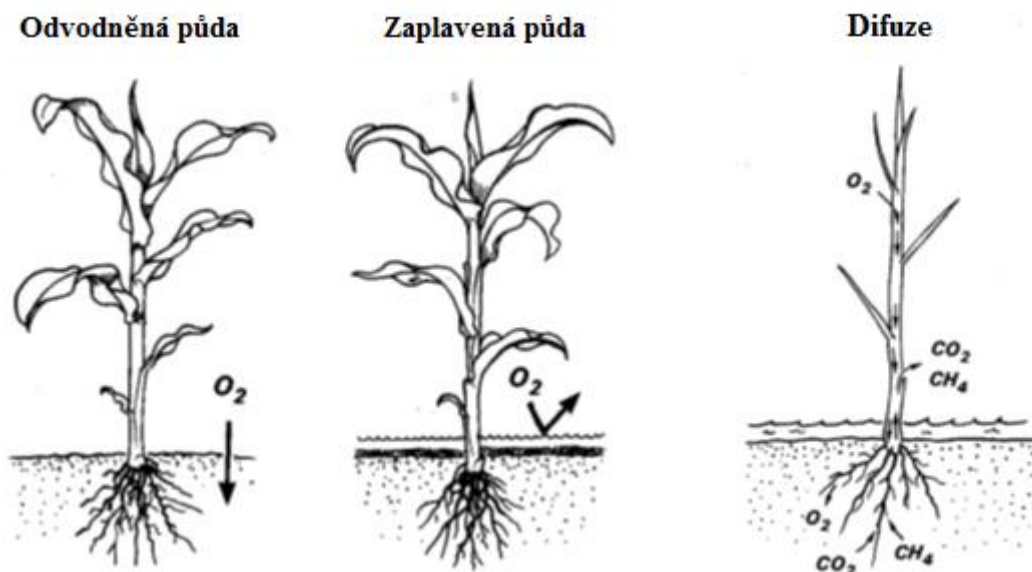
- Organické půdy
- Minerální půdy (Vymazal, 1995).

Organické půdy jsou takové půdy, které hromadí organickou hmotu a to za podmínek, kdy výroba biomasy přesahuje dekompozici. Vyskytují se v mokřadech, kde je nedostatek kyslíku, což má za následek nízkou rychlost dekompozičních procesů (Vymazal, 1995).

Minerální půdy vznikají přísunem materiálu, který nepochází z vlastních zdrojů v mokřadu. Konzistence těchto půd je různorodá od téměř tekutých až po pevné (Vymazal, 1995).

Půda v mokřadech je převážně anaerobní, jelikož je po většinu roku zaplavována vodou. Když je půda odvodněná, vzniknou póry, které se vyplní vzduchem, a tím získá půda kyslík. V opačném případě, je-li půda zaplavena, kyslík pro dýchání si musejí rostliny ke kořenům transportovat z částí rostlin, které jsou nad hladinou vody. Pronikání kyslíku vodou je až 3×10^6 pomalejší než ve vzduchu. Proudění kyslíku do zaplavené a odvodněné půdy je znázorněno na obrázku č. 2 (Brix, 1993).

Vzduch se pomocí kořenů dostává do prostředí kolem kořene, kde vznikají kyslíkové kapsy. V okolí kořene můžeme sledovat rezavou barvu. Jedná se o kysličník, kterým se rostlina brání proniknutí iontů železa a manganu a dává možnost žití mikroorganismům, které by bez kyslíku nepřežili (Eiseltová et Pokorný, 2013).



Obrázek č. 2: Transport kyslíku do nezaplavené a zaplavené půdy a pasivní difuze. (Brix, 1993).

Mokřady jsou periodicky zaplavovány nebo mají v průběhu vegetačního období půdu saturovanou. Hydrologie v mokřadech je velice důležitá pro získávání energie a živin do a z mokřadu. Jejich transport zajišťují srážky, podzemní voda, povrchový tok, záplavy atd. (Vymazal, 1995).

1.4 Koloběh uhlíku v mokřadech

Uhlík patří mezi základní prvky potřebné pro život. V sedimentech se vyskytuje ve formě karbonátových hornin. Redukovaná forma uhlíku se vyskytuje v organických látkách. Ve vzduchu má uhlík několik forem:

- Oxid uhličitý CO_2
- Metan CH_4
- Oxid uhelnatý CO
- Vyšší uhlovodíky
- Organické sloučeniny (Moldan, 2015)

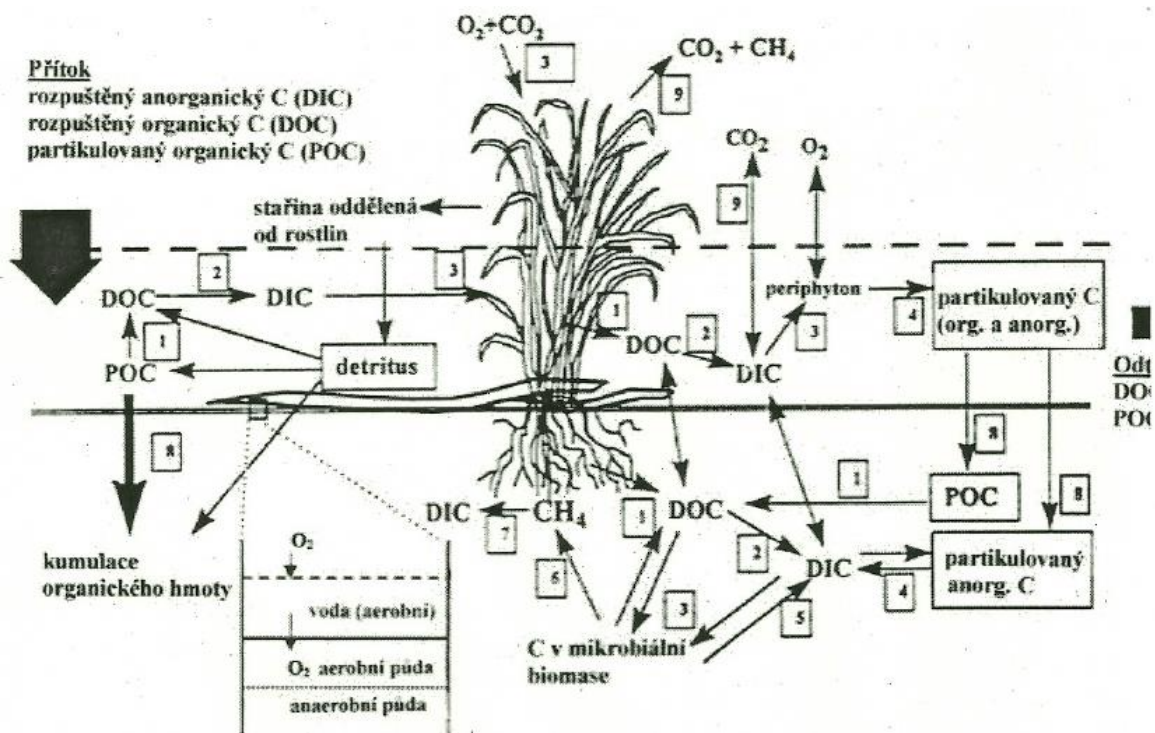
Biochemický cyklus uhlíku má za následek stabilitu mezi fotosyntézou a respirací. Fotosyntéza probíhá v zelených rostlinách, kde se váže oxid uhličitý ze vzduchu, a při účinku slunečního záření se vyvíjejí organické látky (Moldan, 2015).

Dýchání nebo-li respirace, naopak oproti fotosyntéze uvolňuje získanou energii, která je využívána živými organismy, které ji používají pro všechny vlastní životní funkce (Moldan, 2015).

Dle Mitche et Gosseling, 2007 patří mezi hlavní anaerobní procesy v mokřadech fermentace a metanogeneze. K fermentaci organické hmoty dochází v případě, že organická hmota je koncový akceptor elektronu v anaerobním dýchání mikroorganismů a tvoří různorodou nízkou molekulovou hmotnost kyselin, alkoholů a CO₂. Například kyselinu mléčnou a etanol. Studiemi bylo sice prokázáno, že k fermentaci dochází v mokřadech minimálně, ale má nezastupitelnou roli v poskytování substrátu pro bakterie v mokřadním sedimentu. Během procesu jsou sacharidy s vysokou molekulovou hmotností rozloženy na nízkomolekulární organické sloučeniny jako rozpuštěný organický uhlík, kterým se živí další organismy. Metanogeneze je děj, kdy bakterie použije CO₂ jako akceptor elektronu a vyprodukuje plynný metan CH₄. Metan, který se při narušení sedimentu uvolňuje do atmosféry, se nazývá bahenní plyn. Oxidace metanu probíhá za pomoci bakterií, které mění metan na metanol, formaldehyd a na konečný CO₂.

Celý proces koloběhu uhlíku je znázorněn na obrázku č. 3.

1. Fragmentace
2. Mineralizace
3. Rostlinný a mikrobiální příjem
4. Rozpouštění a srážení
5. Respirace
6. Metanogeneze
7. Oxidace metanu
8. Ukládání
9. Těkání a oxidace (Reddy et D'Angelo, 1997)



Obrázek č. 3: Transformace a koloběh uhlíku v mokřadech (Reddy et D'Angelo, 1997).

1.5 Dekompozice v mokřadech

Dekompozice znamená rozklad nebo degradace materiálu. V případě mokřadů se jedná o rozklad rostlinného materiálu a drobných živočichů, z jejichž částic a struktur se stává detrit. Pomalý rozklad v mokřadech vede k hromadění organického materiálu a sedimentů. Téměř většina nadzemní biomasy není spotřebována býložravci, ale zůstává v mokřadu (Vymazal, 1995).

Rozklad rostlinného materiálu hraje významnou roli v koloběhu uhlíku a živin v rámci ekosystému. Tyto biogeomechanické procesy mají dopad na ostatní systémy až v celosvětovém měřítku (Snyder et Rejmánková, 2015).

Dekompozice souvisí s teplotou, pH a obsahem živin v rostlinné tkáni a přítomností mikroorganismů. K rozkladu dochází ve třech fázích. V první části dochází k uvolňování rozpuštěné biomasy – loužení. Následuje mikrobiální rozklad, v kterém jsou uvolňovány polyfenoly a fosfor. Třetí částí je mechanická fragmentace bezobratlými živočichy (Oliveira et al., 2016).

V Egyptě byly provedeny dekompoziční pokusy s listy, oddenky a stonky *P. australis*, kde bylo zjištěno, že dekompozice listů byla významně rychlejší než u oddenků a stonků. V první fázi vedl rychlý výluh a rozpuštění organických látek, k prudkému poklesu hmotnosti, během prvního měsíce. Tyto rozpuštěné organické látky

sloužily jako živiny pro mikroorganismy. Druhá fáze následovala jako fyzikální a biologické rozrušení rostlinného materiálu (Eid et al., 2014).

Mezi nejvýznamnější skupiny organismů, které se podílejí na dekompozici, patří houby a bakterie. Dekompozice v mokřadech může být typu aerobního (přítomnost kyslíku) nebo anaerobního (bez přítomnosti kyslíku). Aerobní dekompozice probíhá:

- ve vzduchu (odumřelé rostliny stojí nebo rostlinná tkáň je stále přirostlá k živým rostlinám,
- ve vodě (odumřelé části spadnou do vody)
- na povrchu vodní hladiny

Anaerobní dekompozice je mnohem pomalejší. Jde o mikrobiální rozklad organické hmoty probíhající v přírodě samovolně. Mikroorganismy postupně rozkládají biologicky rozložitelnou organickou hmotu bez přístupu vzduchu. Konečným produktem je rozložená biomasa, plyny a nerozložený zbytek organické hmoty (Vymazal, 1995).

Z pohledu uhlíku je u aerobních procesů 50 % biomasa a 50 % se přemění na CO₂. U anaerobních pak jde 95 % uhlíku do bioplynu a zbylých 5 % se přemění do biomasy (Vymazal, 1995).

2 Mokřadní rostliny

Mokřadní rostliny jsou takové rostliny, které dokáží žít a růst v půdě která je zatopená trvale či příležitostně (tedy téměř v anaerobním prostředí) a získávat tak kyslík pomocí svých nadzemních částí. Rostliny se těmito podmínkám musely biologicky přizpůsobovat například tvorbou vegetativních reprodukčních orgánů, větší pórovitostí těla rostlin, silnějšími oddenky a květy (Vymazal, 1995).

Makrofyta, jak se mokřadním rostlinám říká, můžeme rozdělit do čtyř skupin:

- Vegetace volně plovoucí
- Vegetace s volně plovoucími listy
- Vegetace ponořená (submerzní)
- Vegetace vynořená (emerzní) (Vymazal, 1995).

V této práci se budeme zabývat sedmi druhy emerzní vegetace, které se vyskytují na výzkumných lokalitách zvolených pro tuto diplomovou práci.

Obecně se dá říci, že mokřadní vegetace poskytuje především podklad pro mikroorganismy, které se podílejí na biodegradačních procesech.

Další funkcí vegetace je zateplení povrchu mokřadu a tvorba specifických podmínek pro tento ekosystém (Vymazal, 2002).

2.1 Rákos obecný - *Phragmites australis*

Rákos obecný (obrázek č. 4) je nejvíce rozšířenou mokřadní rostlinou na světě, která je zastoupena na všech kontinentech (Lambertini et al., 2012). Tvoří široké a velmi husté porosty a díky tomu je patrná možnost využití biomasy jako energetické rostliny (Bonanno et al., 2013). Biomasa dosahuje svého maxima od července do září dle klimatických podmínek (Engloner, 2009). Stébla rostliny mohou dosahovat výšky 1 - 6 m. Daří se jí jak na slunných tak na stinných místech (Himmelhuber, 2014).



Obrázek č. 4: Rákos obecný (foto Rottová, 2016)

Jde o velmi odolnou rostlinu, která je schopna růstu i ve velmi silném znečištění. Rákos lze nalézt na mnoha stanovištích. Ať už se jedná o rašeliniště, močály, litorální zóny jezer, ale i ve slaných a příbřežních mokřadech. Nejlépe se rákosu daří na místech s větším výskytem živin, ale extrémně mnoho živin rostlině škodí, převážně vysoké hodnoty dusíku. Vysoké koncentrace dusíku způsobují:

- pomalejší růst rostliny
- zakrnění rostliny
- skvrny na listech (Romero et Brix, 1999).

Množství biomasy je ovlivněno mnoha faktory, jako je např. hloubka vody, klimatické podmínky, zeměpisná šířka, eutrofizace. Rostlina je velmi pórovitá (Březinová et. Vymazal, 2014).

Clevelingem et al. (2001) bylo prokázáno, že rostliny žijící ve vyšších zeměpisných šířkách mají vyšší tempo růstu a dříve kvetou než v nižších zeměpisných šířkách. Na jihu v teplejších oblastech středního pásma rostliny rostou až do prvních mrazů.

Množství biomasy *P. australis* měřil Vymazal et Kröpfelová (2005) v podmínkách České republiky na přírodních i umělých mokřadech a bylo zjištěno, že množství biomasy se liší a to od 1652 do 5070 g m⁻² s průměrnou hodnotou 3266 g m⁻² (\pm 1050 g m⁻²).

V Egyptě dosáhla biomasa *P. australis* průměrných hodnot ve výši 4550 g m⁻². Proto se využívá jako stavební materiál na střechy nebo ploty (Eid et al., 2014).

2.2 Chrastice rákosovitá - *Phalaris arundinacea*

P. arundinacea (obrázek č. 5) je dlouhověká vytrvalá tráva, která dosahuje výšky až 3 m. Je velice odolná vůči prostředí. Produkuje husté sítě aktivních kořenů, díky kterým se může agresivně vegetativně šířit, čímž vytlačuje původní druhy rostlin a snižuje tak biologickou rozmanitost ekosystému (Lavergne et Molofsky, 2004). Invazí této rostliny se zabývali ve svých studiích i jiní autoři. Odland et del Moral, (2002) prováděli svůj výzkum v Norsku na jezeře Myrkdalen, kde chrastice do tří let od vysazení dominovala na litorálním rybníčním pásmu.

Kořeny *P. arundinacea* dosahují do hloubky 30-40 cm. Vyskytuje se v údolních nivách a v mnoha druzích mokřadů. Tato rostlina roste velmi rychle a má sklony k tvorbě monokultur (Březinová et. Vymazal, 2014).

Je často využívána v kořenových čistírnách odpadních vod. Zejména z těchto důvodů:

- Vynikající klíčivost
- Snadná výsadba
- Rychlý růst
- Izolační schopnost v zimním období (Březinová et. Vymazal, 2014).

Vzhledem ke svému rychlému růstu a velkému množství produkované biomasy má obrovský potenciál jako energetická rostlina (Xiong et al., 2008). Studie Čížková et al. (2015) udává průměrnou sklizeň biomasy jako sušiny 9,5 t ha⁻¹. Lze ji využít i jako pícninu pro býložravce (Čížková et al., 2015).



Obrázek č. 5: Chrastice rákosovitá (foto, URL5)

2.3 Ostřice obecná - *Carex nigra*

Cévnatá rostlina *Carex nigra* (obrázek č. 6) dává přednost mokřadům, ale lze ji nalézt i na místech vysychajících nebo zcela suchých. Pro člověka užitek téměř nemá, ale často se využívá jako okrasná travina do skalek nebo jezírek. Název ostřice získala díky svým ostrým stonkům a listům, o které se lze pořezat (Řepka et Grulich, 2014).



Obrázek č. 6: Ostřice obecná (foto Rottová, 2016)

Tato rostlina je rozšířena téměř na celém území České Republiky mimo nejsušších a nejteplejších území. Vyskytuje se převážně na plochých nebo mírně svažitéch březích vodních toků a ploch. Rozmnožuje se semeny i vegetativně (Honissová et al., 2015). Ostřice mají různý vzhled. Mohou být výběžkaté nebo utváří stoličkovité velmi husté trsy s výběžky. Lodyhy dosahují délky až 95 cm a jsou přímé (Řepka et Grulich, 2014).

Ze studie Košnar et al., (2012), která byla prováděna na území České republiky, vyplývá, že široká variabilita morfologických znaků je dána klimatickými podmínkami dané lokality. Zvýšené husté trsy ostřice jsou obvyklejší před plazivými oddenky.

2.4 Orobinec širokolistý - *Typha latifolia*

Orobinec širokolistý (obrázek č. 7) je typická mokřadní rostlina známá především svým hnědým květenstvím ve tvaru doutníku. Dorůstá do výšky až 2 m. Nejvíce se jí daří v mělkých vodách s dostatkem slunečního světla (Himmelhuber, 2014).

Typha se rozmnožuje dvěma způsoby a to vegetativně pomocí kořenů a za pomoci semen. V Číně se zabývali klíčením této rostliny a dospěli v jejich studii k závěru, že hloubka vody a ošetření semen v činidle má významný vliv na klíčivost rostliny (Meng et al., 2016).





Obrázek č. 7: Orobinec na břehu řeky Chrudimky v Horním Bradle (vlevo), v Praze na Hloubětíně (vpravo) Třeboň (dole), (foto Rottová, 2016)

Orobinci se nejvíce daří v tropických oblastech, kde velice rychle roste. Jeho expanzivní růst v tropických oblastech často způsobuje úhyn ryb z důvodů vyčerpání rozpuštěného kyslíku (Oliveira et al., 2016).

V Brazílii Oliveira (2016) provedla pokus dekompozice *Typhy angustifolie* bez přítomnosti mikroorganismů a s nimi. Z výsledků vyplynulo, že kratší dobu rozkladu má *Typha* s mikroorganismy, ale i tak je její degradace velmi pomalá ve srovnání s jinými rostlinami.

Lidé orobinec využívají jako stavební materiál na výrobu lodí, chat a podložek, ale také na výrobu papíru a i jako biopalivo (Pandey et al., 2014). Pravděpodobně může mít řadu dalších využití. Například bylo prokázáno, že *Typha latifolia* je schopna tolerovat, odstraňovat a přeměňovat 2,4 – dichlorfenol, což je meziprodukt při přípravě herbicidů, který se používá k selekci plevelů, jako půdní hnojivo a je vysoce toxický (Rodriguez-Hernandez et al., 2017).

2.5 Skřípina lesní - *Scirpus sylvaticus*

Skřípina lesní (obrázek č. 8) se vyskytuje na březích a okrajích vodních toků a ploch, kde má po většinu roku mokré podloží, díky kterému se jí daří přijmout více živin a vyprodukovat více biomasy než v suchém podloží (Kuusemets et Lõhmus, 2005).



Obrázek č. 8: Skřípina lesní (foto URL2)

Rostlina kvete v červnu a v červenci a její výška může dosahovat až 1 m (Himmelhuber, 2014). Jedná se o mohutnou rostlinu, která má dutou lodyhu. Listy skřípiny jsou dlouhé a úzké s drsnými okraji. Délka listů často přesahuje lodyhu. Květenství má tvar kužele a roste na vrcholu lodyhy. Květ připomíná drobné zelené klásky. Kvete v průběhu měsíce června a července (URL2).

2.6 Zblochan vodní - *Glyceria maxima*

Zblochan se v podmínkách České republiky vyskytuje převážně na substrátech, které jsou bohaté na živiny. Jedná se o místa na březích rybníků a mokřích luk. *Glyceria maxima* kvete v letních měsících (červenec a srpen) (URL3).

Rostlina pochází z Evropy a roste v trsech (viz obrázek č. 9). Množí se oddenky, které se po odtržení mohou dostat vodním proudem na jiné místo. Dorůstá do výšky 1 m a její stébla i v zimních měsících mají zelenou barvu. Její kořeny vytváří ve vodě řádky, které jsou příhodné na zpevnění břehů. Tato funkce vegetačního filtru přispívá k rozjasnění vody (Himmelhuber, 2014).

Glyceria maxima je považována za jednu z nejinvazivnějších trav na celém světě. Množí se jak semeny tak vegetativně, ale převládá rozmnožování vegetativní. Ve studii

Mugwedi et al.(2014) byla prokázána vysoká životaschopnost semen, která i po fyziologickém období klidu měla vysokou klíčivost, což přispívá k invazivnímu úspěchu ve vodním ekosystému. V Jižní Africe byla nasazena jako krmná rostlina.



Obrázek č. 9: Zblochan vodní (foto URL6)

2.7 Sítina rozkladitá - *Juncus effusus*

Sítina patří mezi nejrozšířenější vodní rostlinu v Evropě, a lze ji nalézt po celém světě. Jedná se o vytrvalou travu, která má jasně zelenou barvu a dorůstá do výšky 30 – 150 cm. Listy se podobají lodyhám, ale jsou mnohem delší (URL4).

Lze ji rozpoznat podle typických hustých trsů, které si v zimních měsících zachovávají zelenou barvu (viz obrázek č. 10). Kvetे od června do září a její květy mají hnědou barvu ve tvaru paliček. Nejvíce se jí daří na místech, kde kolísá vlhkost, kde je dostatek slunce a půda s nepatrným podílem vápenatých solí (Himmelhuber, 2014).

Sítina je v mokřadech využívána k akumulaci kovů, čištění odpadních vod a slouží jako potrava a zároveň i úkryt pro drobné živočichy. Množí se semeny i oddenky (Sarma et Rogers, 2000)



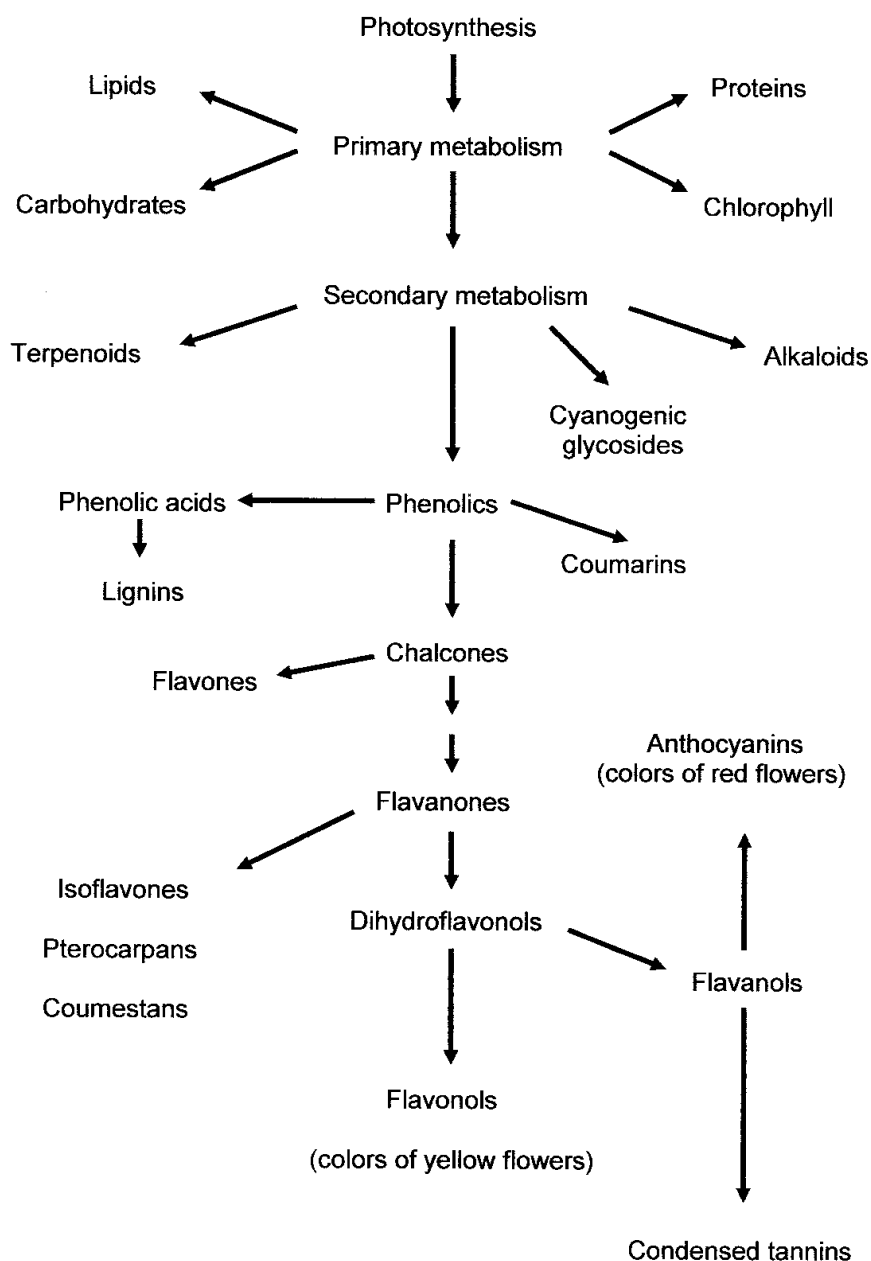
Obrázek č. 10: Sítina rozkladitá (foto URL4)

3 Fenolické látky

Fenolické látky jsou neoddělitelnou složkou lidské a zvířecí stravy. Jedná se o nejpočetnější skupinu rostlinných metabolitů. Fenolické látky obsažené v potravinách jsou využívány pro své antioxidační účinky na lidské zdraví. Používají se například při prevenci a léčbě rakoviny a při onemocnění srdce a cév. Polyfenoly jsou nepostradatelné pro morfologii rostlin. Přispívají k růstu a rozmnožování, zajišťují odolnost proti patogenům a predátorům. Polyfenoly se využívají i v průmyslové výrobě a to na výrobu nátěrových hmot, papíru, kosmetických preparátů, přírodních barviv a konzervačních látek. Fenolické sloučeniny jako jsou flavonoidy, se používají jako antibiotika, při léčbě průjmů, vředů, působí protizánětlivě a lze je využít i při léčbě hypertenze, alergií a vysoké hladině cholesterolu (Bravo, 1998).

Metabolismus rostlin se dělí na primární a sekundární. Primární metabolity jsou například: cukry, tuky, bílkoviny, mastné kyseliny, aminokyseliny a nukleové kyseliny, které jsou potřebné pro život (Giada, 2013).

Sekundární metabolity jsou mnohem různorodější a nacházejí se ve specializovaných buňkách, které nejsou nezbytné k fotosyntéze a k respiraci rostlin, ale jsou nepostradatelné pro přežití rostliny v prostředí. Sekundární metabolity chrání rostlinu před býložravci, viry a bakteriemi, vysílají signály, aby přilákaly opylující hmyz, a slouží i jako ochrana před ultrafialovým zářením. Vztah mezi primárními a sekundárními metabolity je znázorněn na obrázku č. 11 (Giada, 2013).



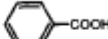
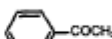
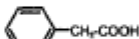
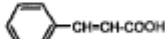
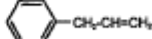
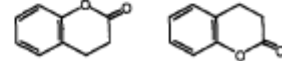
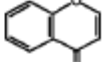
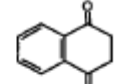
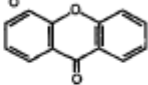
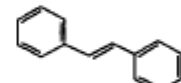
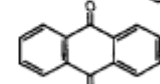


Obrázek č. 11: Vztah mezi primárními a sekundárními metabolity (Giada, 2013).

Fenolické látky a fenoly obsažené v rostlinách jsou sekundárními metabolity, které splňují širokou škálu fyziologických rolí v rostlinách. Vyšší rostliny jsou v současné době schopné produkovat tisíce různých fenolických sloučenin. Tato schopnost byla vyselektována během evolučního vývoje rostlinných druhů a díky tomu se rostliny lépe vypořádaly se stále se měnícími podmínkami životního prostředí (Lattanzio, 2013).

Růst rostliny je závislý na živinách, které v půdě rozkládají mikroorganismy. Tento proces, je ale velice zdlouhavý. Polyfenoly, které do půdy vstupují vodou, působí jako

regulátory půdních procesů a mohou ovlivnit aktivitu společenství rozkladačů při rozkladu a koloběhu živin. Některé druhy rozpustných polyfenolů (kyselina ferulová, gallová nebo flavonoidy) mají za následek stimulaci při klíčení a růstu hub a plísní (Lattanzio, 2013).

Třída	Vzorec	Skladba
Simple phenols	C_6	
Benzoquinones	C_6	
Phenolic acids	C_6-C_1	
Acetophenones	C_6-C_2	
Phenylacetic acids	C_6-C_2	
Hydroxycinnamic acids	C_6-C_3	
Phenylpropenes	C_6-C_3	
Coumarins, isocoumarins	C_6-C_3	
Chromones	C_6-C_3	
Naftoquinones	C_6-C_4	
Xanthones	$C_6-C_1-C_6$	
Stilbenes	$C_6-C_2-C_6$	
Anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoids	$C_6-C_3-C_6$	
Lignans, neolignans	$(C_6-C_3)_2$	
Lignins	$(C_6-C_3)_n$	

Obrázek č. 12: Hlavní třídy polyfenolických látek, (Bravo, 1998).

Rostliny se potkávají s mnohými škůdci a bakteriemi. Reakcemi na tato napadení může být tolerance nebo rezistence, které pomáhají k přežití organismu. Rezistentní mechanismy vystavují překážky nebo omezují útok. Mechanismy tolerance neomezují útok, ale zmírňují účinky napadení nebo nemoci. Rostlina se brání tím, že produkuje velké množství fenolových látek, které mají jak funkci odpudivou, tak funkci pro získávání živin z okolí. Přežití rostliny závisí na rychlém rozpoznání patogenu a následné okamžité

obranné reakci. Fenolické látky rozpoznávají patogen a spustí obrannou reakci imunitního systému (Lattanzio, 2013).

Polyfenoly se v přírodě mohou vyskytovat od jednoduchých molekul (fenolové kyseliny) až po polymerizované molekuly (taniny). Na obrázku č. 12 jsou znázorněny základní chemické struktury hlavních polyfenolových sloučenin. Nejvýznamnější skupinou polyfenolů jsou flavonoidy (Bravo, 1998).

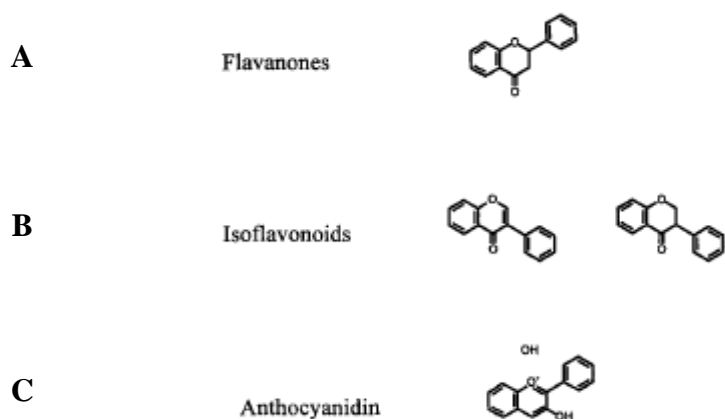
3.1 Fenolové kyseliny a flavonoidy

Jednoduché kyseliny a flavonoidy jsou nejčastěji se vyskytující fenolové sloučeniny (Bravo, 1998).

Flavonoidy se značí $C_6 - C_3 - C_6$ a jsou složeny ze dvou aromatických částí, které jsou spojeny třemi atomy uhlíku. Dohromady tvoří takzvaný okysličený hetero-cyklus (Bravo, 1998).

Flavonoidy se velmi hojně vyskytují v citrusových plodech a ve švestkách. Isoflavony jsou obsaženy převážně v luštěninách. Anthokyany jsou rozpustné rostlinné pigmenty ve vodě. Klasifikace flavonoidů je znázorněna na obrázku č. 13 (Bravo, 1998).

Anthokyany poskytují rostlinám červenou, modrou a fialovou barvu pro zbarvení květů a plodů. Toto zbarvení slouží nejen jako vizuální podnět k přilákání opylovačů, ale také jako jejich ochrana. Jsou to i pigmenty, které jsou zodpovědné za zbarvení listů listnatých stromů. Změna barvy listu není pouze projevem stárnutí. Za podzimním zbarvením listů stojí karotenoidy (žlutá a oranžová) a anthokyany (červená - fialová). Karotenoly jsou sice v listech celý rok, ale do podzimu jsou skryty pod zeleným chlorofylem, který se na podzim rozpadá na bezbarvé molekuly. Červená barva listů chrání před škodlivými účinky světla v nižších teplotách a díky tomu, má lepší vstřebávání živin. Další výzkumy ukázaly, že červená barva na listech způsobuje horší chuť pro zvířata, je méně viditelná pro zvířata a vyznačuje signály o své nízké kvalitě listů. Červená barva listů na podzim také pomáhá při orientaci hmyzu při její migraci (Lattanzio, 2013).



Obrázek č. 13: Klasifikace flavonoidů, (Bravo, 1998).

3.2 Fenolické látky v rostlinách

Mezi rostliny s vysokým obsahem fenolických látek patří tmavá listová a pestrobarevná zelenina, sójové boby a kakao. V ovoci se také nachází nezanedbatelné množství fenolických látek, nejvíce v bobulovitých a citrusových plodech. Jak je vidět v tabulce č. 1, jsou fenolické látky široce rozšířené v potravinách rostlinného původu (Giada, 2013).

Tabulka č. 1: Fenolické látky ve vybraných potravinách rostlinného původu (Giada, 2013)

Druh	fenolické látky [mg/100g]
Sójové boby	4,14
Bazalka	44,25
Koriandr	3,74
Máta	4,00
Paprika černá	16,00
Paprika bílá	8,00
Tymián	16,46
Grep	8,93
Citrón	8,43
Pomeranč	13,43
Černý rybíz	6,70

Rejmánková (2015) měřila obsah fenolických látek v mokřadních rostlinách různými metodami v závislosti na obsahu živin v mokřadu a ve skleníku. V tabulce č. 2 jsou vybrány pouze mokřadní rostliny, u kterých bylo množství fenolických látek měřeno metodou Folin- Ciocalteu.

Tabulka č. 2: Porovnání množství fenolických látek v mokřadních rostlinách měřený metodou FC (Rejmánková, 2015)

Druh	fenolické látky [%]
Orobinec širokolistý – <i>Typha latifolia</i>	2,5
Ostřice – <i>Carex spp.</i>	1,5 – 4
Šáchor hlíznatý <i>Cyperus rotundus</i>	1,4

Dle Rejmánkové (2015) mají fenolické látky v mokřadních rostlinách vliv na pomalejší dekompozici, což má za následek významný dopad pro narůstání sedimentu v mokřadech a zároveň vede k většímu zadržování uhlíku.

Starší biomasa z mokřadních rostlin je zdrojem uhlíku pro mikroorganismy v sedimentech a při loužení, jako rozpuštěná hmota může ovlivnit přilehlé vodní toky. Rozdíly v obsahu fenolických látek v mokřadních rostlinách mohou mít významný vliv na dekompozici. V případě, že bude docházet k častější eutrofizaci mokřadů a tím se bude zvyšovat obsah fenolických látek v makrofytech, může dojít k významnému nárůstu sedimentů (Rejmánková, 2015).

Fenoly snižují aktivitu enzymů při trávení. Žížaly a termity jsou schopni trávit fenolické látky alespoň částečně. Fenoly jsou v půdních procesech regulátory a inhibují nitrifikaci, stejně jako rozklad a recyklaci živin. Vstupují do půdy výluhem nadzemních a podzemních částí rostlin (Hättenschwiler et Vitousek, 2000).

4 Analytické metody stanovení fenolických látek v rostlinách

Jelikož jsou fenolické sloučeniny obsaženy v široké škále rostlin (ovoce, zelenina, obiloviny, luštěniny, čaj, káva atd.), které mají různou povahu a chemické vlastnosti, je proto velice obtížné vybrat jedinou metodu. Nejprve je vhodné vzorky dostatečně upravit. Usušené vzorky rostlin se namelou nebo nadrtí, aby získaly potřebnou velikost částic. Kapalně vzorky se odstřeďují, filtrují a čistí za pomoci separačních systémů (Khoddami et al., 2013).

Mezi nejdůležitější kroky při analýze fenolických látek patří příprava vzorku a jeho extrakce. Poté následuje klasifikace a kvantifikace. Veškeré fenolické sloučeniny mají velké absorpční vlastnosti v UV záření. Každá ze tříd fenolických sloučenin vykazuje jinou absorpční charakteristiku (Lattanzio, 2013).

4.1 Extrakční metody

Komplexní extrakce fenolických sloučenin se provádí za pomoci anorganických nebo organických rozpouštědel. Ve většině případů jsou rostlinné fenolické látky rozpustné v polárních organických rozpouštědlech, mezi nejznámější patří:

- Voda (Vodík?)
- Metanol
- Etanol
- Kyselina octová (Lattanzio, 2013)
- Aceton (Singleton et al., 1999)

Parametry jako je čas, teplota, počet opakování extrakce vzorku nebo rozpouštědla nebo poměr rozpouštědla a vzorku, volba rozpouštědla ovlivňuje výsledek (Khoddami et al., 2013).

Existují rovněž metody extrakce, které zkracují čas výluhu:

- Ultrazvukově asistovaná extrakce (SAE)
- Ultrazvuková/mikrovlnná asistovaná extrakce (UMAE)
- Superkritická kapalinová extrakce (SFE)
- Sub-kritická vodní extrakce (SCWE)
- Extrakce vysoko hydrostatickým tlakem (HHPP) (Khoddami et al., 2013).

4.2 Kvantifikace fenolických látek

Klasifikace a kvantifikace se provádí za pomoci jedné z těchto metod:

- Spektrometrie

- Plynové chromatografie (GC)
- Kapalinové chromatografie (HPLC)
- Kapilární elektroforéza (ES) (Khoddami et al., 2013).

Mezi nejúčinnější metody určování kvantifikace fenolických látek patří kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) nebo jejich kombinace s hmotnostní spektrometrií (Khoddami et al., 2013).

4.2.1 Spektrometrická analýza

Spektrometrické metody patří mezi jednodušší metody pro kvantifikaci fenolických látek. Pro určení fenolických látek mohou být použita různá činidla, která na určité fenolové látky reagují různými barvami (Harborne, 1993). Mezi nejznámější spektrometrické metody patří Folin – Denis a Folin – Ciocalteu metody, které se používají již mnoho let. Podstatou obou metod je využití chemické reakce s použitím činidla, které obsahuje wolfram a molybden. Výsledky této reakce s přítomnými fenolickými látkami mají tmavě modrou barvu. Tato modrá barva má široké spektrum vstřebávání světla. Činidla využitá v obou metodách nereagují pouze s fenoly, ale také s kyselinou askorbovou, cukry a dalšími (Khoddami et al., 2013).

Folin-Ciocalteu metoda

Jedná se o spektrofotometrickou metodu, která je známá již od roku 1927.

Na výrobu Folin-Ciocalteu činidla je zapotřebí rozpustit 100 g wolframu sodného a 25 g molybdenu sodného v 700 ml destilované vody. Po-té přidáme 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Vaříme v nádobě se zpětným chladičem po dobu 10 hodin. Po 10 hodinách ukončíme zahřívání, vypláchneme zpětný chladič malým množstvím vody a v mírně zchlazeném roztoku necháme rozpustit 150 g síranu lithného. Správně namíchaný a uvařený roztok by měl mít žlutou barvu a měl by být úplně čirý (Singleton et al., 1999).

Vzorek, s obsahem fenolických látek při přidání činidla získá modro zelenou barvu. Čím je modrá barva tmavší, tím je ve vzorku obsaženo větší množství fenolů. Naopak vzorek bez obsahu fenolických látek je bezbarvý. Některé kapalné vzorky se mohou analyzovat na přímo nebo v případě potřeby zředěné (Singleton et al., 1999).

Pro určení fenolických látek mohou být použita různá činidla, která na určité fenolové látky reagují různými barvami (Harborne, 1993).

4.2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je využívána pro oddělení, identifikaci a kvantifikaci různých fenolových látek. Jedná se o flavonoidy, fenolické kyseliny a kondenzované taniny (Khoddami et al., 2013).

Činidel pro plynovou chromatografii se používá celá řada. Při jejich použití záleží na druhu stanovené fenolické látky. V chromatografu se vzorek, který má být analyzován odpaří do plynné formy při teplotě 200 – 300 °C a smísí se s proudem nosného plynu (Ar, He, N₂, nebo H₂). Tato plynná směs vstupuje do dělicího úseku, kde se přesouvá na kolonu. Složky se v koloně oddělí, dle různých schopností látek a na konci kolony je zaznamenává detektor. Datový systém zpracovává údaje a sestavuje z nich graf za pomoci detektoru, který vysílá signál s časovými údaji. Tato metoda se nedoporučuje u látek, které mají vysokou molekulovou hmotnost, jsou velmi polární a termolabilní (Stashenko et Ren, 2014).

4.2.3 Vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie má výhodu oproti ostatním kvantifikačním metodám ve velmi vysokém rozlišení a citlivé kvantifikační analýze v jednom testu. Bylo prokázáno, že metodou HPLC lze zjistit více druhů fenolických látek z jediné analýzy. Má ovšem jeden zápor a tím je vysoká pořizovací cena a náklady na provoz přístroje (Harborne, 1993).

Používá se při dělení látek tuhých, které musejí být rozpustné v rozpouštědlech, zředěných kyselinách nebo ve vodě a při dělení kapalných látek, které nejsou tolik těkavé. Při kvantifikační metodě HPLC, se nejčastěji používají rozpouštědla jako acetonitril a metanol. První fází celého procesu je čištění. Ze surového extraktu se za pomoci rozpouštědel odstraní interferenční sloučeniny a následně se provede chromatografie. V procesu oddělování vzniká mnoho druhů interakcí (Khoddami et al., 2013).

5 Cíle práce

Pro tuto diplomovou práci byly stanoveny dva hlavní cíle:

- Stanovit a porovnat obsah fenolických látek v nadzemní biomase různých druhů mokřadních rostlin.
- Porovnat obsah těchto látek v mokřadních rostlinách vyskytujících se na různých mokřadních lokalitách.

K dosažení těchto cílů bylo v první řadě potřeba vytipovat lokality vhodné k odběru potřebné biomasy dle diverzity druhů makrofyt. Dále byl stanoven harmonogram veškerých prací. A dále následovala sklizeň, sušení a homogenizace mokřadních rostlin dle časového plánu.

Ve vzorcích byly pomocí spektrometrické metody Folin – Ciocalteu stanoveny koncentrace fenolických látek.

Výsledky této práce by měly napomoci k řešení otázek, zda má druh mokřadní rostliny vliv na množství fenolických látek v biomase, zda má lokalita vliv na množství fenolických látek v biomase rostlin a v neposlední řadě tato studie přispěje k rozšíření informací o fenolických látkách v makrofytech v klimatických podmínkách České republiky.

II Metodika

6 Výzkumné lokality a sběr vzorků

6.1 Výzkumné lokality

Pro předkládanou práci bylo vybráno sedm mokřadních lokalit. Lokality leží ve třech krajích. Ve Středočeském kraji je pět výzkumných lokalit a to Březnice, Běloky, Chmelná, Louňovák a Pařez. V Pardubickém kraji je Horní Bradlo a na Vysočině se nachází Moraveč viz obrázek č. 14.



Obrázek č. 14: Výzkumné lokality v přehledu mapy České republiky (zdroj, Mapy Google), kde 1 - Běloky, 2,3 – Louňovák a Pařez, 4 – Horní Bradlo, 5 – Chmelná, 6 – Březnice a 7 – Moraveč.

Obec Březnice se nachází v okrese Příbram v blízkosti Rožmitálu pod Třemšínem. Výzkumná lokalita březnická mokrá louka je ve zvláště chráněném území rybníků Oblouček a Holubovský rybník. Jedná se o přírodní památku, kde se vyskytuje ohrožený druh žaby kuňky. Tato oblast patří do evropsky významných lokalit. Území se rozkládá na Středočeské pahorkatině s hlinitopísčitými a hlinitými sedimenty (AOPK, 2016).

Běloky jsou situovány na jihovýchodě okresu Kladno. V nivě Dolanského potoka jsou hlinité, štěrkovité až kamenité sedimenty. Niva spadá do evropsky významné lokality Zákolanského potoka, jelikož se v něm vyskytuje chráněný rak kamenáč (Běloky, 2012).

Obec Chmelná se nachází v okrese Benešov v blízkosti města Vlašim. Výzkumná niva se nalézá cca 300 m za obcí směrem na obec Jeníkov a je v blízkosti silnice. Sedimenty jsou nezpevněné a složeny z hlíny, písku a štěrku (ČGS, 2017).

Louňovický rybník a vodní plocha Pařez jsou propojeny Jevanským potokem. Jsou od sebe vzdáleny cca 500 m a umístěny v oblasti Praha-východ v obci Louňovice. Vzorky byly odebrány z litorálních pásem na severní straně rybníků i vodní plochy. V obou jsou sedimenty hlína, písek a štěrk (ČGS, 2017).

Obec Horní Bradlo je situována v Pardubickém kraji v okrese Chrudim. Odběrné místo vzorků je na břehu řeky Chrudimky přímo u mostu směrem na Dolní Bradlo. Nezpevněný nivní sediment s hlínou, štěrkem a pískem (ČGS, 2017).

Moraveč se nachází v kraji Vysočina v okrese Pelhřimov. Výzkumný mokřad je v blízkosti Moravečského rybníka do kterého teče Cerekvický potok. Mokřad je v územním systému ekologické stability. Jeho sedimenty obsahují hlínu, písek a štěrk (ČGS, 2017).

6.2 Sběr nadzemní biomasy

Nadzemní biomasa sedmi druhů makrofyt byla sklížena ze sedmi zmíněných lokalit (tabulka č. 3) dle stanoveného harmonogramu (tabulka č. 4).

Do studie bylo zahrnuto těchto sedm druhů mokřadních rostlin:

- *Phragmites australis*
- *Phalaris arundinacea*
- *Typha latifolia*
- *Glyceria maxima*
- *Scirpus sylvaticus*
- *Juncus effusus*
- *Carex nigra*

Tabulka č. 3: Zkoumané lokality v ČR

Název lokality	Charakteristika území	Sledované rostliny
Březnice	Mokrá louka	1,2,3,4,5,6
Bělky	Niva	1,2,3,5,7
Chmelná	Niva	1,2,3,5,6,7
H. Bradlo	Břeh potoka	2,3,5,7
Louňovák	Litorální rybníční pásmo	1,2,4,6
Moraveč	Zaplavovaný mokřad	2,5,7
Pařez	Litorální rybníční pásmo	1,2,4,5,6

1-*Phragmites australis*, 2-*Phalaris arundinaca*, 3-*Typha latifolia*, 4-*Glyceria maxima*, 5 -*Scirpus sylvaticus*, 6-*Carex nigra*, 7-*Juncus effusus*.

Tabulka č. 4: Harmonogram prací na rok 2016

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Rešerše	x	x	x	x	x	x						
Odběr nadzemní biomasy rostlin						x		x		x		x
Stanovení fenolických látek v biomase						x	x	x	x	x	x	x
Zpracování výsledků								x	x	x	x	x

Celá studie byla provedena v roce 2016, kdy se většina zainteresovaných vzorků sklídila na konci měsíce června a další rostliny byly sklizeny v měsíci srpnu, říjnu a prosinci téhož roku, aby byla sledována i sezónní dynamika. Veškeré vzorky byly odebrány ve třech opakováních. Odběr nadzemní biomasy na lokalitě Horní Bradlo je na obrázku č. 15.



Obrázek č. 15: Odběr nadzemní biomasy na lokalitě Horní Bradlo (foto Rottová, 2016)

7 Materiálové a přístrojové vybavení

7.1 Přístroje a zařízení

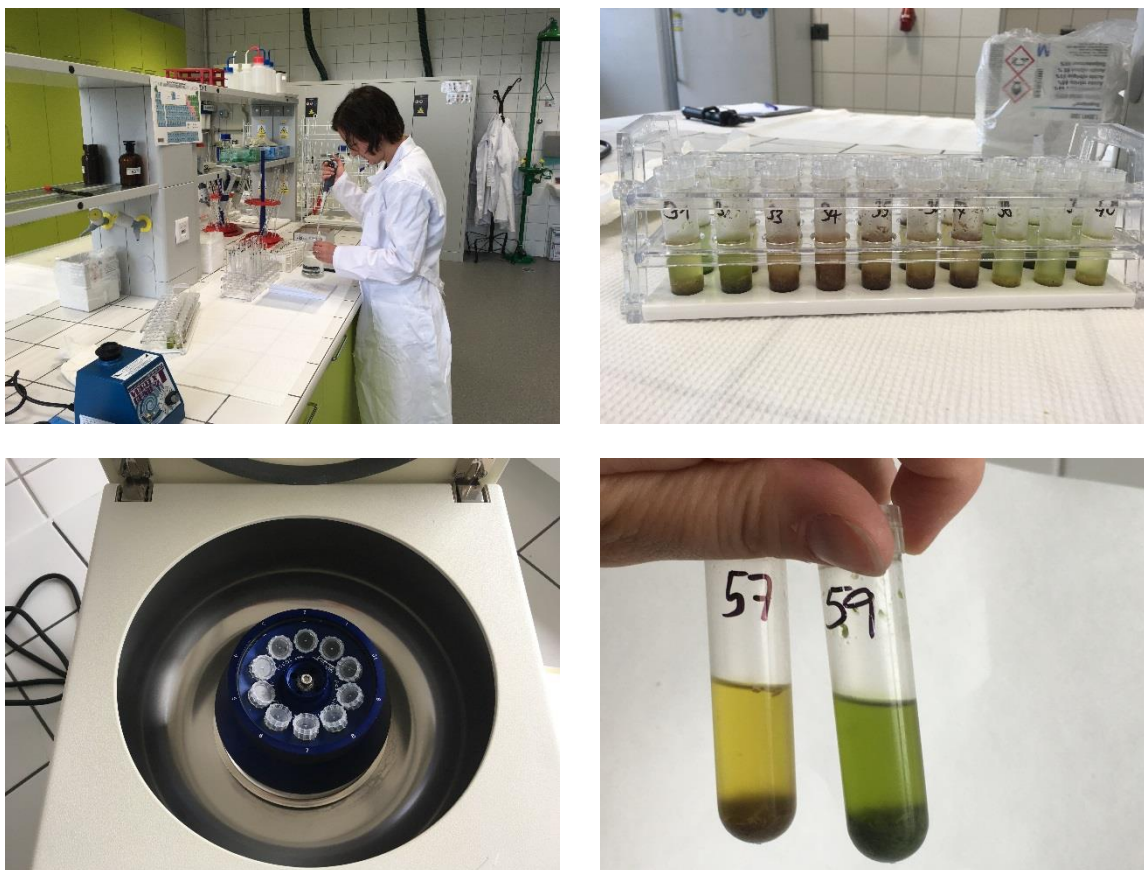
- Zahradnické nůžky
- Sušárna
- Řezací mlýnek
- Analytické váhy
- Pipety
- Zkumavky
- Odstředivka (Centrifuge MPW-251)
- Spektrofotometr (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis)

7.2 Chemikálie

- Kyselina tanová
- Aceton 70%
- 2% roztok Na_2CO_3
- 0,1N NaOH
- Folin-Ciocalteu fenolové činidlo (Sigma Aldrich)

8 Analytická metoda

Sklizená biomasa byla rozdělena na stonky a listy (v případě nutnosti), sušena při teplotě 60 °C (sušárna Memmert) a následně byla homogenizována pomocí řezacího mlýnku se sítím o velikosti ok 0,5 mm. Homogenizovaný rostlinný materiál cca 0,1 g byl extrahován v 5 ml 70 % acetonu po dobu jedné hodiny při teplotě 4 °C (obrázek č. 16).

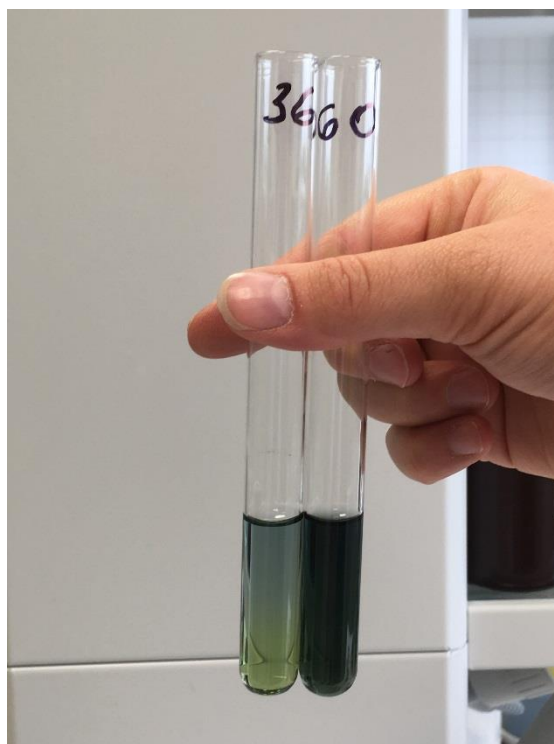
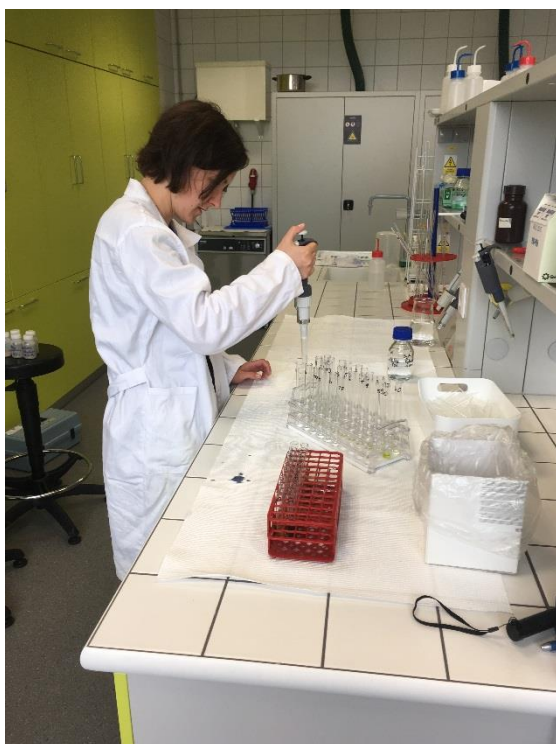
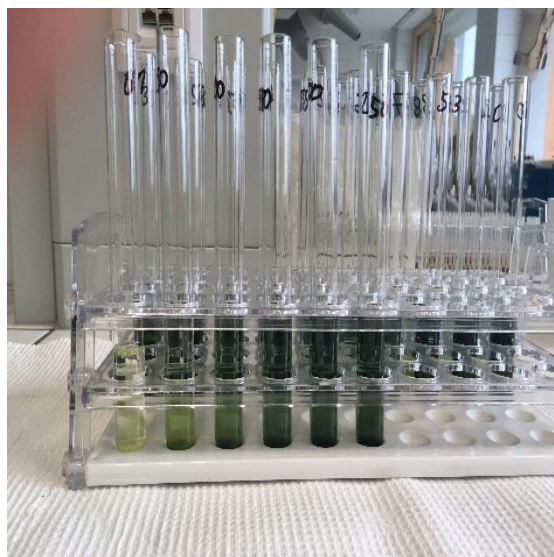
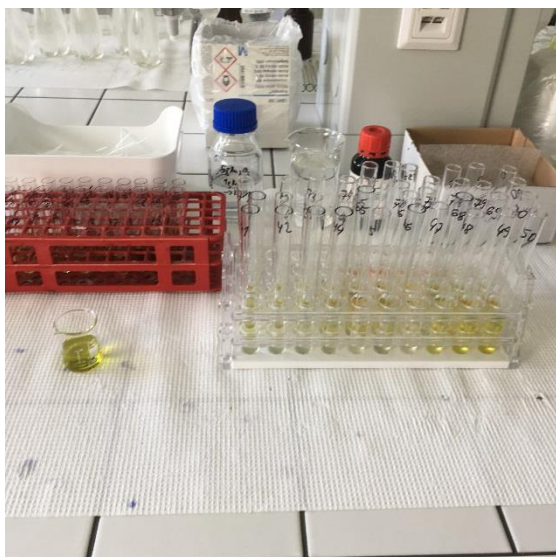


Obrázek č. 16: Extrakce a odstředění vzorků (foto Rottová, 2016)

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven spektrometrickou metodou Folin-Ciocalteu. Standardní roztok v rozmezí od 0 do 250 mg/l (tabulka č. 5) byl připraven z kyseliny tanové rozpuštěné v 70 % acetonu. Odstředěný extrakt ze vzorku či standardní roztok byl přenesen do zkumavky, k němu byl přidán 2 % roztok Na_2CO_3 v 0,1 NaOH a Folin – Ciocalteu činidlo (v poměru 1:2 s deionizovanou vodou). Absorbance modrozeleného zabarvení byla změřena po 120 minutách při 760 nm za pomoci spektrofotometru Cary UV-Vis. Postup je znázorněn na obrázku č. 17.

Tabulka č. 5: Tabulka pro přípravu kalibračních roztoků v mg/l

Koncentrace mg/l	0	50	100	150	200	250
Standardní roztok (kyselina tanová 250 mg/l) ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Demineralizovaná voda ml	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0



Obrázek č. 17: Reakce činidla se vzorky (foto Rottová, 2016)

9 Zpracování a statistické vyhodnocení výsledků

9.1 Zpracování výsledků

Pomocí spektrofotometru byly ve všech vzorcích stanoveny hodnoty koncentrací fenolických látek v 5 ml extraktu (mg/l), které byly pomocí známé navážky vzorku přepočítány na koncentraci fenolů v biomase rostlin (v g/kg suché váhy).

Analýza byla provedena ve všech replikacích odebraných vzorků, z čehož byl spočítán průměr pro jednotlivou rostlinu na dané lokalitě.

9.2 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické výpočty byly provedeny ve statistickém programu R s použitím jednocestné Anovy, neboť bylo pracováno s více skupinami (různé druhy makrofyt). Kategoriální proměnná je druh mokřadní rostliny a závislá proměnná je obsah fenolických látek v rostlině. Nejprve byly stanoveny hypotézy:

- H_0 – Druh mokřadní rostliny nemá vliv na obsah fenolických látek
- H_a – Druh mokřadní rostliny má vliv na obsah fenolických látek.

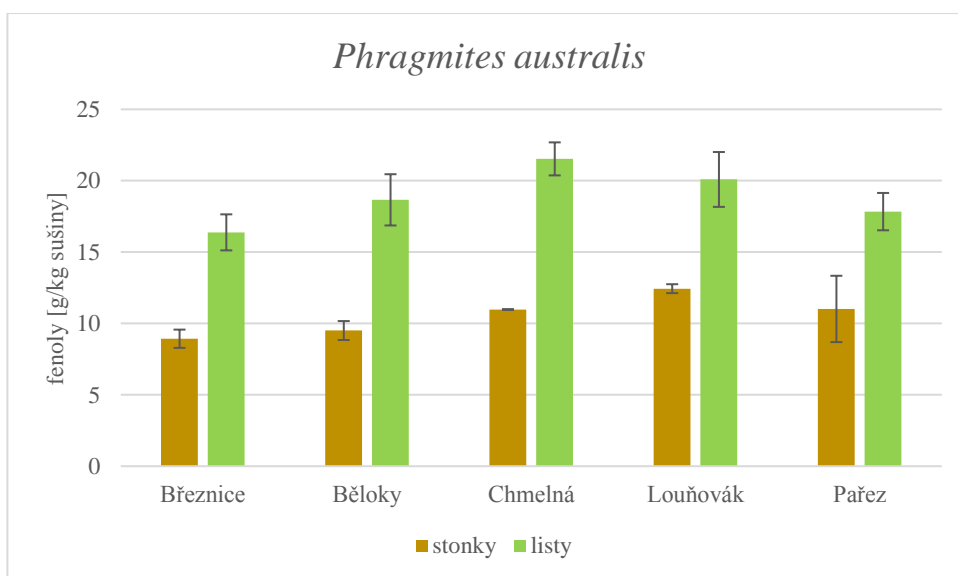
Test byl proveden na 95 % hladině významnosti. Homogenita variancí byla ověřena Bertlettovým testem a na základě jeho výsledku byla stanovena hladina významnosti, která byla menší než 0,05 a tím byla zamítnuta nulová hypotéza H_0 . Dále byl proveden neparametrický Kruskal – Wallisův test, kterým byla potvrzena odlišnost obsahu fenolických látek mezi jednotlivými druhy makrofyt. Aby bylo zjištěno, které druhy se od sebe statisticky významně liší, byl proveden Tukey-ho test.

III Výsledky práce

10 Výsledky

10.1 Koncentrace celkových fenolických látek v mokřadních rostlinách na různých lokalitách

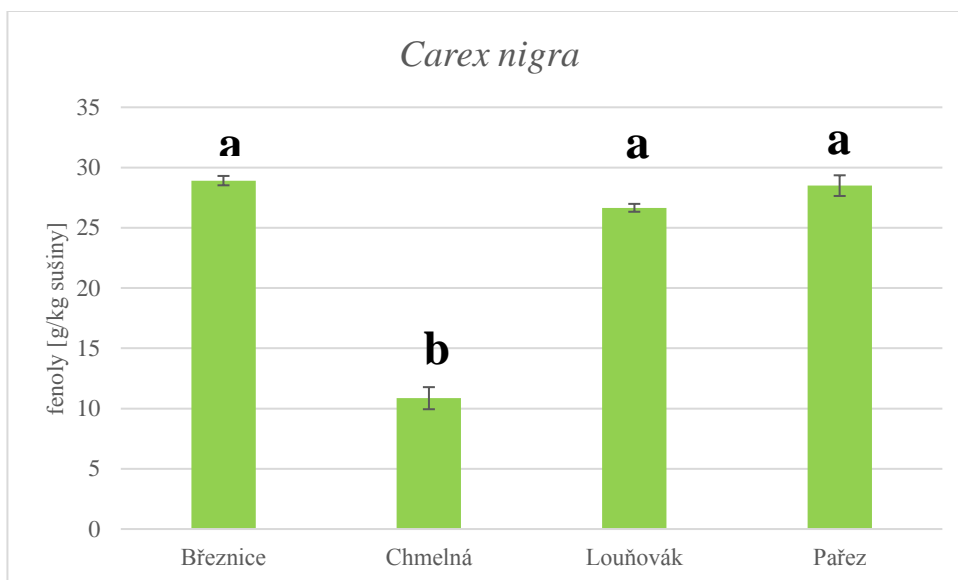
Výsledky této studie ukazují, že koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase mokřadních rostlin se může lišit v závislosti na vzorku, lokalitě, ale i na druhu mokřadní rostliny a jejího umístění. Například koncentrace celkových fenolických látek ve stoncích a listech *Phragmites australis* ve vzorku z června na pěti různých místech je znázorněn na obrázek č. 18. Nejvyšší koncentrace v listech byla zaznamenána v Chmelné ($21,53 \pm 1,16$ g/kg sušiny). Naopak nejnižší hodnota byla zaznamenána u Březnice ($16,38 \pm 1,26$ g/kg sušiny). V případě stonků byla nejvyšší koncentrace v Louňovák ($12,4 \pm 0,31$ g/kg sušiny) a nejnižší v Březnici ($8,92 \pm 0,64$ g/kg sušiny). Rozdíly mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou u stonků a listů jsou 25 % u listů a 28 % u stonků.



Obrázek č. 18: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Phragmites australis* na různých lokalitách

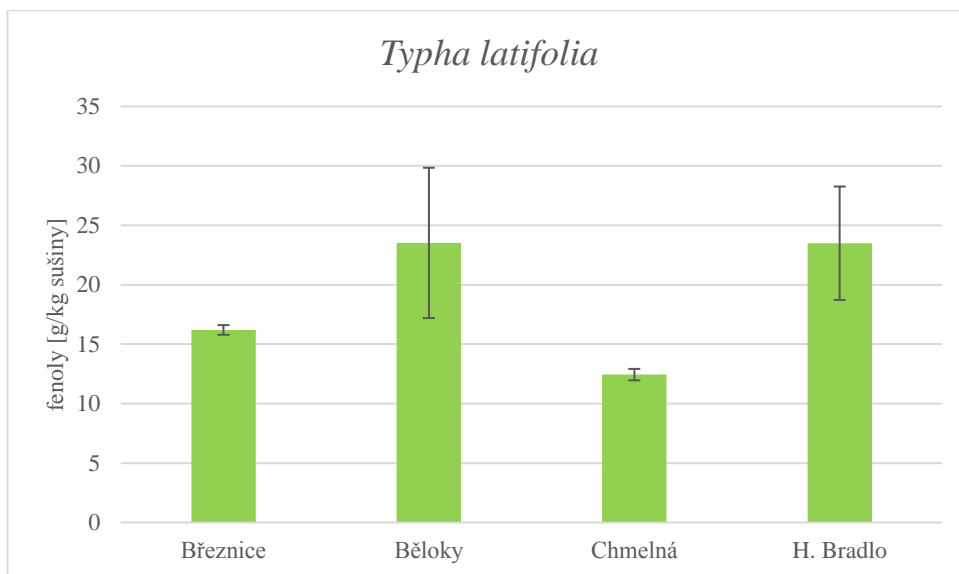
Vzorky *Carex nigra* byly odebrány ze čtyř různých přírodních mokřadů. Nejvyšší koncentrace celkových fenolických látek byla naměřena v Březnici ($28,92 \pm 0,39$ g/kg sušiny) a velmi těsně ji následovaly další dvě lokality, Pařez ($28,50 \pm 0,86$ g/kg sušiny)

a Louňovák ($26,66 \pm 0,33$ g/kg sušiny). Nízké hodnoty byly zaznamenány v Chmelné, kde byla koncentrace pouze $10,86 \pm 0,92$ g/kg sušiny. Vše znázorněno na obrázku č. 19. Rozdíl mezi průměrnými naměřenými hodnotami nejvyšší a nejnižší koncentrace je 62 %.



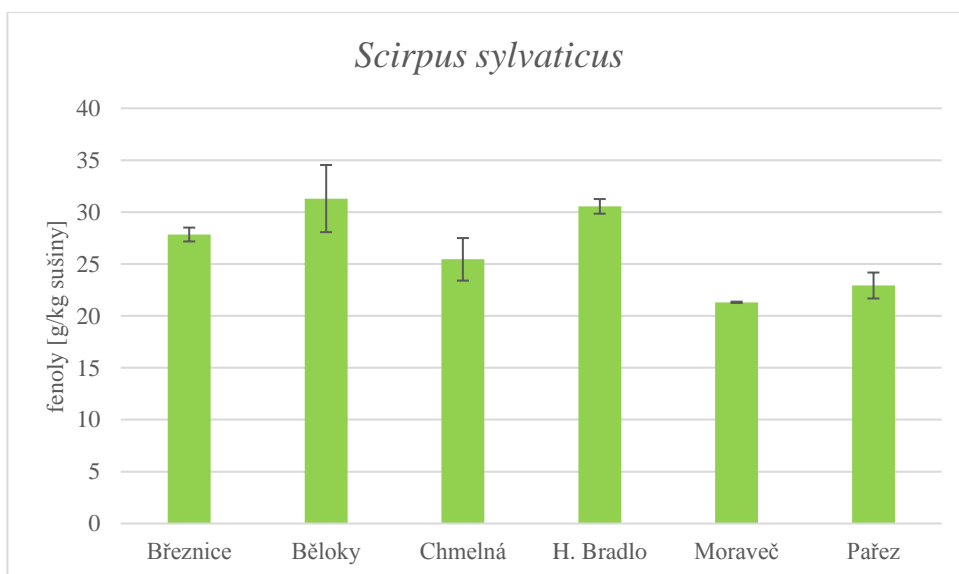
Obrázek č. 19: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Carex nigra* na různých lokalitách, písmena značí statisticky významný rozdíl na 95 % hladině významnosti.

Podobná situace byla pozorována i u *Typha latifolia* obrázek č. 20, která byla sklizena na čtyřech různých lokalitách. Nejvyšší koncentrace byla naměřena v Běloky ($23,52 \pm 6,32$ g/kg sušiny) a v Horním Bradle ($23,49 \pm 4,71$ g/kg sušiny). Nižší hodnoty byly pozorovány v Březnici ($16,20 \pm 0,41$ g/kg sušiny) a nejnižší hodnoty byly opět naměřeny v Chmelné ($12,44 \pm 0,48$ g/kg sušiny). Rozdíl mezi průměrnými naměřenými hodnotami nejvyšší a nejnižší koncentrace je 47 %.



Obrázek č. 20: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Typha latifolia* na různých lokalitách

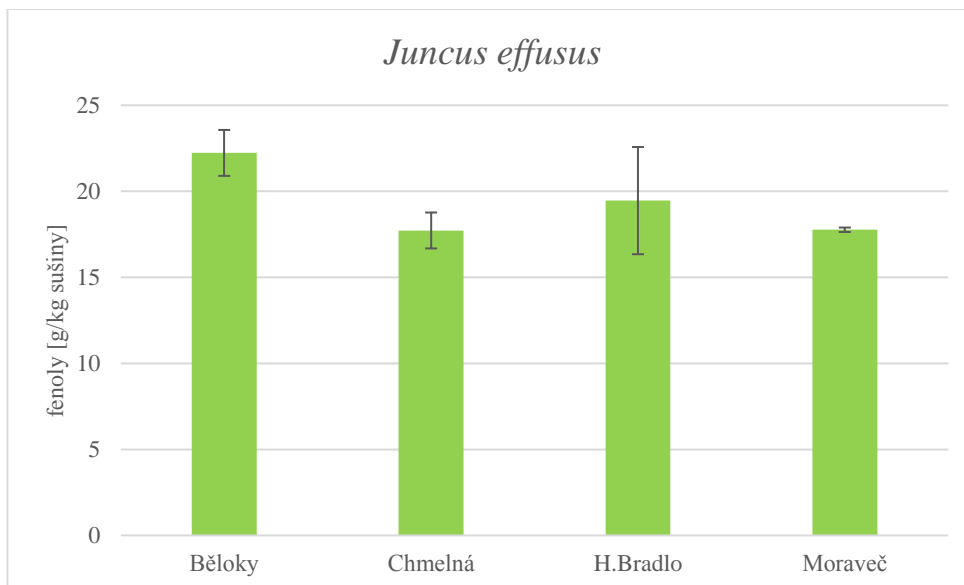
Vzorky *Scirpus sylvaticus* byly odebrány na největším počtu sledovaných míst a rozdíly mezi jednotlivými stanovišti nebyly tak výrazné jako v předchozích dvou případech. Nejvyšší koncentrace byla v Bělky ($31,30 \pm 2,24$ g/kg sušiny) a nejnižší v Moravči ($21,31 \pm 0,07$ g/kg sušiny) viz obrázek č. 21. Procentuální rozdíl byl 32 %.



Obrázek č. 21: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Scirpus sylvaticus* na různých lokalitách

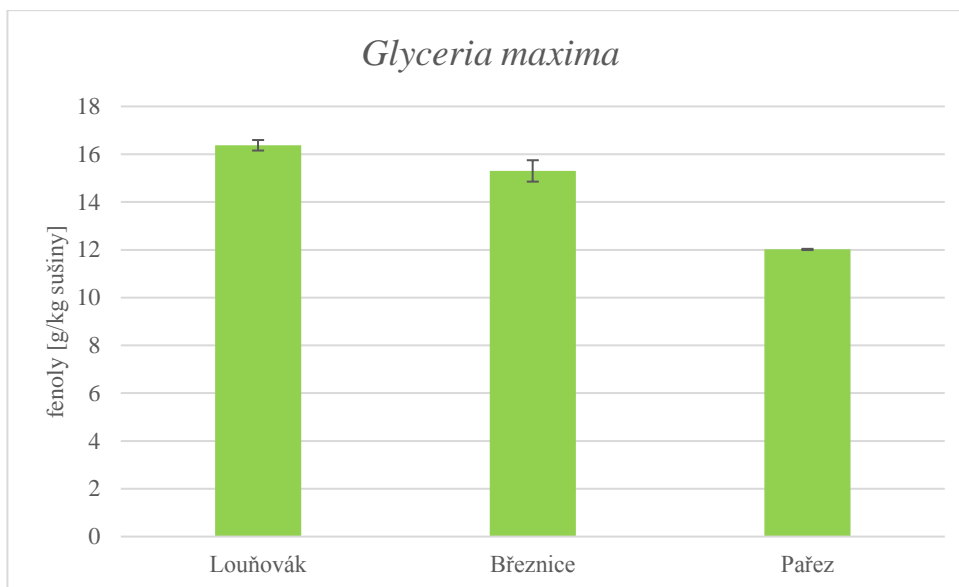
Podobná situace byla pozorována u *Juncus effusus* obrázek č. 22. Rostlinné vzorky této rostliny byly odebrány ze čtyř různých stanovišť, kde nejvyšší naměřené hodnoty byly v Bělky ($22,23 \pm 1,34$ g/kg sušiny) a nejnižší koncentrace fenolických látek byly

naměřeny jako v případě *Typhy latifolia* a *Carex nigra* v Chmelné ($17,73 \pm 1,04$ g/kg sušiny) a v Moraveč ($17,77 \pm 0,13$ g/kg sušiny). Rozdíl mezi průměrnými naměřenými hodnotami nejvyšší a nejnižší koncentrace je 20 %.



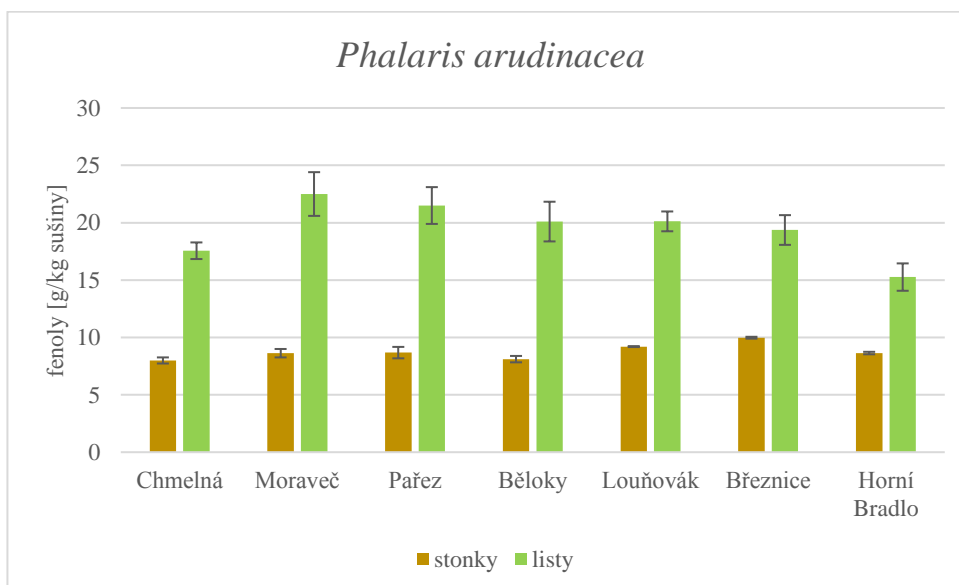
Obrázek č. 22: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Juncus effesus* na různých lokalitách

Vzorky *Glyceria maxima* byly odebrány na nejmenším počtu sledovaných míst a to celkem na třech. Rozdíl v obsahu fenolických látek nebyl tak výrazný. Nejvyšší hodnota byla naměřena na Louňováku ($16,38 \pm 0,22$ g/kg sušiny) následována Březnicí ($15,30 \pm 0,44$ g/kg sušiny) a nejnižší hodnoty byly zaznamenány na Pařezu ($12,02 \pm 0,03$ g/kg sušiny) viz obrázek č. 23. Rozdíl mezi průměrnými naměřenými hodnotami nejvyšší a nejnižší koncentrace je 27 %.



Obrázek č. 23: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Glyceria maxima* na různých lokalitách

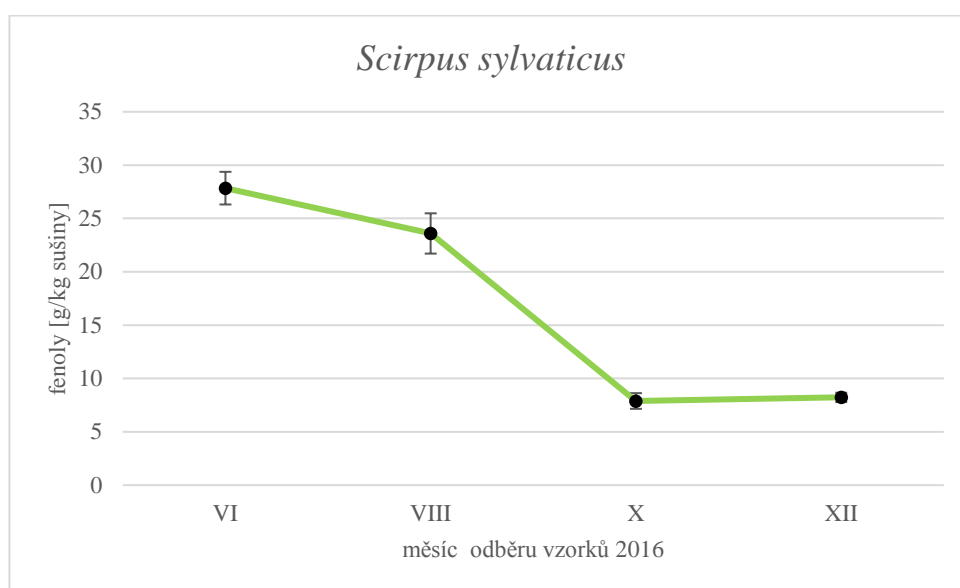
Stejně jako u *Phragmites australis* byly fenolické látky měřeny u *Phalaris arudinacea* ve stoncích a listech. Ve stoncích byly naměřeny nejvyšší hodnoty fenolických látek v Březnici ($9,98 \pm 0,08$ g/kg sušiny) a nejnižší ve Chmelné ($8,00 \pm 0,27$ g/kg sušiny). Naopak nejvyšší koncentrace v listech byla naměřena v Moravči ($22,50 \pm 1,91$ g/kg sušiny) a nejnižší v Horním Bradle ($15,26 \pm 1,19$ g/kg sušiny). Vše je znázorněno na obrázku č. 24. Rozdíly mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou u stonků a listů jsou 32 % u listů a 20 % u stonků.



Obrázek č. 24: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Phalaris arudinacea* na různých lokalitách

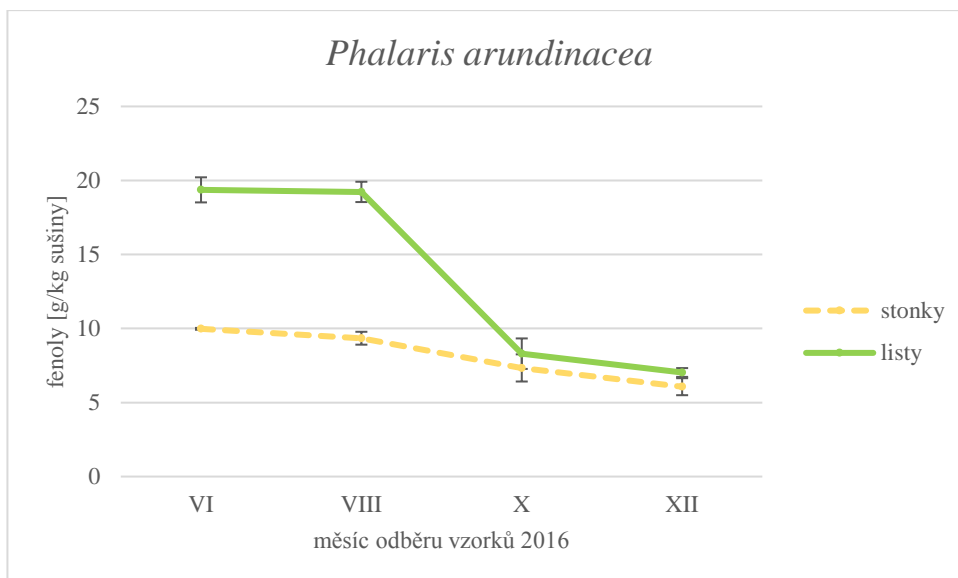
10.2 Sezónní dynamika koncentrace celkových fenolických látek

Koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase vzorku z *Scirpus sylvaticus* v období od června do prosince 2016 je znázorněn na obrázku č. 25, kde je patrný pokles koncentrace fenolických látek od nejvyšší hodnoty naměřené v červnu ($27,84 \pm 1,53$ g/kg sušiny) k nejnižší naměřené hodnotě v říjnu ($7,88 \pm 0,733$ g/kg sušiny). Od října zůstaly naměřené hodnoty na nízké úrovni až do prosince. Podobné chování bylo pozorováno v listech *Phalaris arundinacea* (obrázek č. 26), kde průměrná koncentrace byla nejvyšší v červnu ($19,36 \pm 0,84$ g/kg sušiny) a během letních měsíců. Od podzimu se snížili až do prosince, kde byla pozorována nejnižší hodnota ($7,03 \pm 0,30$ g/kg sušiny).



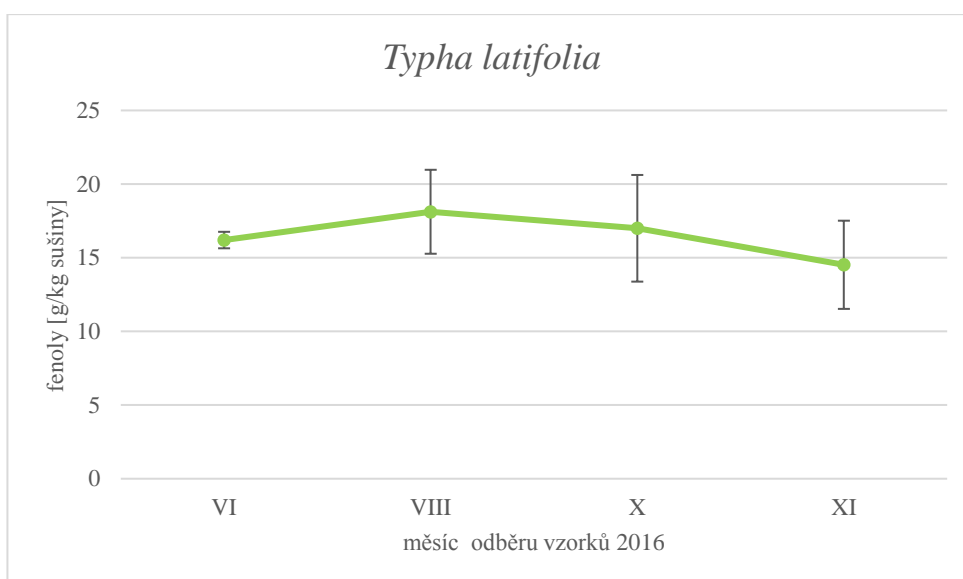
Obrázek č. 25: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Scirpus sylvaticus* v průběhu období od června do prosince 2016 z lokalit Březnice, Chmelná, Moraveč a Pařez.

Na druhé straně, sezónní dynamika koncentrace fenolických látek ve stoncích stejné rostliny vykazovaly trochu odlišný průběh. Průměrná koncentrace se také snížila od června do prosince, ale pokles byl pozvolný a to z $9,97 \pm 0,06$ g/kg sušiny na $6,07 \pm 0,57$ g/kg sušiny.



Obrázek č. 26: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Phalaris arundinacea* v průběhu období od června do prosince 2016 z lokalit Březnice, Běloky, Moraveč a Horní Bradlo.

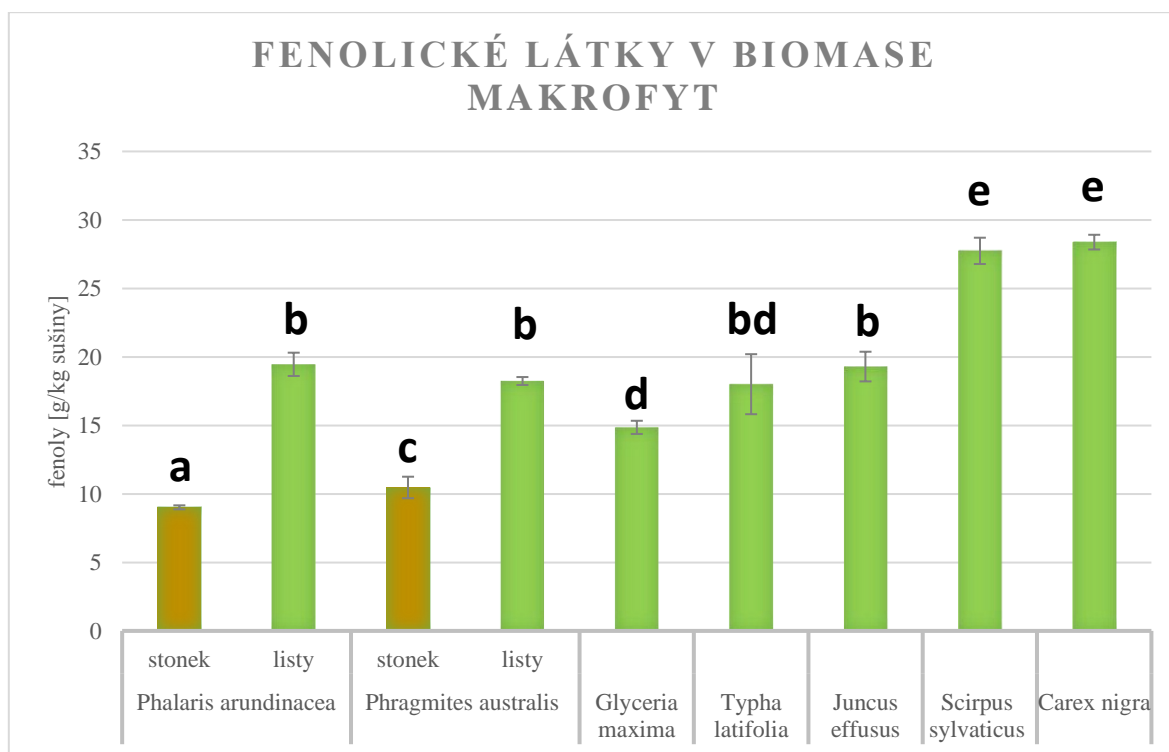
Úplně odlišné chování bylo pozorováno u *Typha latifolia* v obsahu fenolických látek (obrázek č. 27). Nejvyšší hodnota byla zaznamenána v srpnu ($18,12 \pm 2,85$ g/kg sušiny) a nejnižší hodnota byla zaznamenána v listopadu ($14,52 \pm 2,99$ g/kg sušiny). Přesto rozdíly mezi průměrnými koncentracemi každého měsíce byly velice nízké, a tak s přihlédnutím k směrodatné odchylce lze říci, že obsah celkových fenolů v rostlině je poměrně stabilní v průběhu celého sledovaného období.



Obrázek č. 27: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase *Typha latifolia* v průběhu období od června do prosince 2016 z lokalit Březnice, Běloky a Chmelná.

10.3 Celkové fenolické látky v sedmi mokřadních rostlinách

Průměrná koncentrace fenolických látek v nadzemní biomase všech sedmi sledovaných rostlin v červnu na všech zkoumaných lokalitách je uvedena na obrázku č. 28. Koncentrace celkových fenolických látek se pohybovala mezi zkoumanými druhy a v různých částech rostlin stejně. Nejnížší koncentrace byly zaznamenány ve stoncích *Phalaris arundinacea* ($9,02 \pm 0,14$ g/kg sušiny) a následně ve stoncích *Phragmites australis* ($10,47 \pm 0,78$ g/kg sušiny). Nejvyšší koncentrace byly pozorovány v *Scirpus sylvaticus* ($27,74 \pm 0,96$ g/kg sušiny) a v *Carex nigra* ($28,39 \pm 0,54$ g/kg sušiny).



Obrázek č. 28: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase sedmi druhů makrofyt sklizených ze sedmi lokalit v červnu 2016, písmena značí statisticky významný rozdíl na 95 % hladině významnosti.

11 Diskuze

Tato studie sledovala koncentraci fenolických látek u sedmi druhů mokřadních rostlin na sedmi přírodních lokalitách v České republice. Z výsledku vyplývá, že obsah fenolických látek se mění v závislosti na druhu a části rostliny, době a místu odběru. Průměrná koncentrace těchto látek v této studii se pohybovala v rozmezí od $9,02 \pm 0,14$ g/kg sušiny do $28,39 \pm 0,54$ g/kg sušiny v závislosti na druhu rostliny (viz obrázek č. 28) a průměrná hodnota byla $18,59 \pm 1,20$ g/kg sušiny. Naměřené hodnoty je velice obtížné porovnat s dostupnou literaturou, neboť, jak již bylo několikrát zmíněno, jedná se o poměrně novou problematiku, které do současné doby nebylo věnováno příliš mnoho pozornosti. Nicméně se zdá, že dva autoři, kteří se této oblasti věnují, došli k velmi podobným výsledkům.

Rejmánková (2015) zkoumala obsah fenolických látek na dvou druzích mokřadních rostlin. S touto studií lze porovnat pouze *Typha latifolia*, která se shoduje se zkoumanými mokřadními rostlinami a obsah fenolických látek byl měřen stejnou metodou. Hodnoty se pohybovaly v rozsahu 22 až 46 g/kg sušiny. V naší studii byla naměřena průměrná koncentrace u *Typha latifolia* 18,1 g/kg sušiny, což odpovídá danému rozsahu. Rejmánková (2015) rovněž sledovala obsah fenolů v této rostlině v umělých podmínkách, přičemž výsledné koncentrace byly výrazně vyšší, než ty v přirozených podmínkách.

Harrison (2017) sledovala fenolické látky v 19 druzích mokřadních rostlin a její výsledky byly velice variabilní jak mezi jednotlivými druhy rostlin, tak na lokaci odebraného vzorku. U *Phragmites australis* byla v naší studii naměřena průměrná hodnota 18,2 g/kg sušiny a u Harrison (2017) 12,9 g/kg sušiny. V případě *Phalaris arundinacea* jsme stanovili průměrnou hodnotu 19,5 g/kg sušiny a u Harrison (2017) 13,9 g/kg sušiny. Ve srovnání průměrných hodnot *Typha latifolia* byla dosaženo největšího rozdílu a to 18 g/kg sušiny v naší studii a u Harrison (2017) 8,9 g/kg sušiny. U mokřadní rostliny *Juncus effesus* byl rozdíl mezi průměrnými hodnotami nejmenší. V této diplomové práci byla stanovena hodnota 19,3 g/kg sušiny a u Harrison (2017) 17,9 g/kg sušiny. Průměrná hodnota u Harrison (2017) byla stanovena na 10,4 g/kg sušiny a u nás byla průměrná hodnota 18,59 g/kg sušiny. Z uvedeného tedy vyplývá, že výsledky z naší a zmíněné studie se výrazně neliší. Větší či menší rozdíly mezi naší průměrnou hodnotou a Harrison (2017), mohou být zapříčiněny rozdílnými klimatickými podmínkami a salinitou mokřadů.

Při srovnání s jinými rostlinami je patrné, že mokřadní rostliny nejsou nejvýznamnějším zdrojem fenolických látek, ale zároveň nejsou zanedbatelným zdrojem.

Ze studie Giada (2013) vyplývá, že jedním z významnějších zdrojů v obsahu fenolických látek než v mokřadních rostlinách je bylina bazalka a to 44,25 g/kg sušiny. U ostatních rostlin se jedná přibližně o stejný obsah fenolických látek jako u mokřadních rostlin až na borůvku. V tymiánu bylo stanoveno 16,46 g/kg v sušině. Významným zdrojem fenolických látek je i cibule šalotka s 17,18 g/kg sušiny. Černý pepř obsahuje 16,00 g/kg sušiny. Z citrusových plodů má největší obsah fenolických látek pomeranč 13,43 g/kg sušiny. Jahody jsou také zdrojem fenolických látek. Lester et al. (2012) naměřil průměrnou hodnotu 24,91 mg/100g čerstvé hmotnosti. Naměřené vzorky byly z pěti odrůd jahod a ze dvou sklizní, ale jelikož je obsah fenolických látek uveden v čerstvém stavu, je velice obtížné tyto hodnoty porovnat s hmotností v sušině.

Borůvky patří mezi významné zdroje fenolických látek. Bujor et al. (2016) měřil obsah fenolických látek v plodech borůvky v letech 2013 a 2014 metodou Folin – Ciocalteu, přičemž ke stanovení využil dva druhy rozpouštědel (vodu a 55 % etanol). Při použití vody byla průměrná hodnota stanovena 31,8 g/kg sušiny (2013) a 30,5 g/kg sušiny (2014). S použitím 55 % etanolu jako rozpouštědla byly naměřeny hodnoty v roce 2013 41,9 g/kg sušiny a v roce 2014 byla hodnota 34,7 g/kg sušiny.

Ve srovnání s obilnými vločkami a rýží dopadly mokřadní rostliny s obsahem fenolických látek lépe. Sumczynski et al. (2015) měřila obsah fenolických látek v pěti druzích müsli s pšeničnými vločkami, které byly srovnány s vločkami komerčními (také metodou Folin – Ciocalteu). Průměrné hodnoty ve vločkách se pohybovaly od 3,96 g/kg sušiny do 8,86 g/kg sušiny. Nejvyšší hodnota byla naměřena u červených pšeničných vloček a nejnižší u komerčních vloček. Průměrné hodnoty v müsli se pohybovaly od 5,65 g/kg sušiny do 10,72 g/kg a také byly nejvyšší hodnota naměřena u červených pšeničných vloček a nejnižší u müsli komerčního. Hodnoty fenolických látek byly měřeny také v hnědé rýži a to 3,35 g/kg sušiny zrn také metodou Folin – Ciocalteu (Zhou et al., 2014).

Z výsledků je také patrné, že obsah fenolických látek se významně liší ve stoncích a listech, jak je znázorněno na obrázcích č. 18 a č. 24. Tento fakt nebyl překvapující, neboť popsána skutečnost byla publikována již v několika studiích. Např. bylo potvrzeno, že velká skupina fenolických látek (flavonoidy) jsou ukládány více v částech rostlin, které jsou vystaveny přímému světlu (Lattanzio, 2013). Tento jev potvrzují i jiní autoři na jiných druzích rostlin. U *Vaccinium myrtillus* byl stanoven obsah fenolických látek v listech 106,9 g/kg sušiny a ve stoncích 98 g/kg sušiny (Bujor et al., 2016). Což rostlinu borůvku řadí mezi nejvýznamnější zdroje fenolických látek.

V rámci předkládané práce byla rovněž sledována sezónní dynamika koncentrace fenolických látek u tří druhů mokřadních rostlin a to *Scirpus silvaticus*, *Phalaris arundinacea* a *Typha latifolia* viz obrázky č. 25, č. 26 a č. 27. U prvních dvou rostlin byl průběh velice podobný a koncentrace v průběhu sezóny postupně klesala. Naopak u orobince byl průběh odlišný a koncentrace byly v průběhu sezóny poměrně stabilní. Nejvyšší naměřená hodnota byla v srpnu. Sezónní dynamikou se zabýval i Bujor et al. (2016) ve své studii o borůvkách. Měřil obsah fenolických látek ve stoncích a listech v květnu, červenci a září. Nejnížší stanovené hodnoty byly v květnu a nejvyšší v červenci v době zrání plodů, jak u stonků tak listů (Bujor et al., 2016).

Rozdílné hodnoty obsahu fenolických látek na jednotlivých lokalitách se statisticky významně liší pouze u *Carex nigra*, jak je patrné z obrázku č. 19. Rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší koncentrací je 62 %. U ostatních rostlin jsou rozdíly následující: *Phragmites australis* u stonků 28 % a u listů 25 %, *Typha latifolia* 47 %, *Scirpus sylvaticus* 32 %, *Juncus effusus* 20 %, *Glyceria maxima* 27 % a *Phalaris arundinacea* u stonků 20 % a 32 % u listů. Tudíž vzniká prostor pro rozšíření této studie o další lokality, kde by mohly být rozdíly patrnější.

Z uvedených výsledků vyplývá, že obsah fenolických látek se mění v závislosti na druhu a části rostliny, době a místu odběru v některých případech. Tato problematika se sice touto studií rozšířila, ale stále jsou další otázky, které by bylo dobré podpořit dalším výzkumem.

12 Závěr

1. Mokřadní ekosystémy jsou významným rezervoárem uhlíku, jehož hromadění napomáhá pomalá dekompozice charakteristická pro tyto ekosystémy.
2. Mokřadní rostliny jsou takové rostliny, které dokáží žít a růst v půdě která je zatopená (trvale či příležitostně).
3. Fenolické látky jsou obsaženy ve všech rostlinách. Tyto látky zvyšují obranyschopnost rostlin, díky čemuž mohou rostliny lépe reagovat na změny klimatických podmínek.
4. Fenoly snižují aktivitu enzymů při trávení, působí jako půdní regulátory a mohou inhibovat nitrifikaci, stejně jako rozklad a recyklaci živin.
5. Ze získaných výsledků vyplývá, že množství fenolických látek ve studovaných rostlinách se liší v závislosti na druhu a části rostliny, lokálně v některých případech a době a místě odběru.
6. Při srovnání s jinými druhy a plody vyplývá, že mokřadní rostliny nejsou nejvýznamnějším zdrojem fenolických látek, ale zároveň nejsou zdrojem zanedbatelným.
7. Poznatky z této práce by měly napomoci k rozšíření informací dané problematiky a v neposlední řadě k rozšíření informací o obsahu fenolických látek v makrofytech v klimatických podmínkách České republiky.

Seznam použité literatury:

Odborné publikace:

- Bonanno, G., Cirelli, G. L., Toscano, Pavone. 2013. Heavy metal content in ash of energy crops growing in sewage-contaminated natural wetlands: Potential applications in agriculture and forestry? *Science of The Total Environment*. 452-453.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*. 56 (11). 317-333.
- Brix, H., 1993: Macrophyte-mediated oxygen transfer in wetlands: transport mechanisms and rates. In Moshiri, G.A. (ed.), *Constructed wetlands for water quality improvement*. CRC Press, Boca Raton, p. 391–398.
- Březinová, T., Vymazal, J. 2014. Competition of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands with horizontal subsurface flow – does it affect BOD5, COD and TSS removal? *Ecological Engineering*. 73. 53-57.
- Bujor, O. -C., Le Bourvellec, C., Volf, I., Popa, V. I., Dufour, C. 2016. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 213. 58-68.
- Cleveling, O. A., Brix, H., Lukavská. 2001. Geographic variation in growth responses in *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* [online]. 69 (2-4).
- Čížková, H., Rychterová, J., J. 2015. Biomass Production in Permanent Wet Grasslands Dominated with *Phalaris arundinacea*: Case Study of the Třeboň. *The Role of Natural and Constructed Wetlands in Nutrient Cycling and Retention on the Landscape* [online]. Springer International Publishing. Cham.
- Eid, E. M., Shaltout, K. H., Al-Sodany, Y. M. 2014. Decomposition dynamics of *Phragmites australis* litter in Lake Burullus, Egypt. *Plant Species Biology*. 29 (1). 47-56.
- Eiseltová, M., Pokorný, J. 2013. THE ROLE OF WETLANDS AND AMELIORATION OF CLIMATE CHANGE IN AN AGRICULTURAL LANDSCAPE – SUMMARY OF CURRENT KNOWLEDGE: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2013 (sborník příspěvků). Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 328 s. ISBN: 978-80-7427-131-1.

- Engloner, A. I. 2009. Structure, growth dynamics and biomass of reed (*Phragmites australis*) – A review. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 204 (5). 331-346.
- Erwin, K. L. 2009. Wetlands and global climate change: the role of wetland restoration in a changing world. *Wetlands Ecology and Management*. 17 (1). 71-84.
- Giada, M. de L. R. 2013. Socioeconomic renovation in Viet Nam: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech.
- Graça, M. A. S., Bärlocher, F., Gessner, M. O. 2005. *Methods to study litter decomposition: a practical guide*. Springer. New York. ISBN: 14-020-3348-6.
- Harborne, J. B. 1993. *Plant phenolics*. 2.pr. Academ. Press. London [u.a.]. ISBN: 01-246-1011-0.
- Harrison, M. M., Tyler, A. C., Hellquist, C. E., Pagano, T. 2017. Phenolic content of invasive and non-invasive emergent wetlandplants. *Aquatic Botany*. 136. 9.
- Hättenschwiler, S., Vitousek, P. M. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology*. 15 (6). 238-243.
- Himmelhuber, P. 2014. *Zahradní rybníčky, potůčky a koupací jezírka: [stavba krok za krokem]*. Grada. Praha. ISBN: 978-80-247-3327-2.
- Honissová, M., Hovorka, F., Kuncová, M. 2015. Seasonal dynamics of biomass partitioning in a tall sedge, *Carex acuta* L. *Aquatic Botany*. 125.
- Just, T. 2003. *Revitalizace vodního prostředí: všem, kteří si přejí udělat z příkopů a kanálů zase potoky a řeky*. 2003. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky. Praha. 144 s. ISBN: 80-860-6472-7.
- Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 18 (3). 2328-2375.
- Košnar, J., Štech, M., P. 2012. Environmental control of clonal growth in *Carex nigra*: What can be masked under the name *Carex nigra* subsp. *juncella* in the Czech Republic? *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 207 (4).
- Kuusemets, V., Lõhmus, K. 2005. Nitrogen and Phosphorus Accumulation and Biomass Production by *Scirpus sylvaticus* and *Phragmites australis* in a Horizontal Subsurface

- Flow Constructed Wetland. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 40 (6-7). 1167-1175.
- Lambertini, C., Sorrell, B. K., Riis, T., B., H. 2012. Exploring the borders of European Phragmites within a cosmopolitan genus. *AoB Plants*. 2012. pls020-pls020.
- Lattanzio, V. 2013. *Phenolic Compounds: Introduction. Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.
- Lavergne, S., Molofsky, J. 2004. Reed Canary Grass (*Phalaris arundinacea*) as a Biological Model in the Study of Plant Invasions. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 23 (5).
- Lester, G. E., Lewers, K. S., Medina, M. B., Saftner, R. A. 2012. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*. 27 (1). 102-107.
- Meng, H., Wang, X., 2016. Seed germination environments of *Typha latifolia* and *Phragmites australis* in wetland restoration. *Ecological Engineering*. 96.
- Mitsch, W. J., Gosselink. 2007. *WETLANDS*. 4th ed. Wiley. Hoboken, N.J. ISBN: 978-047-1699-675.
- Mitsch, W. J., Gosselink, J. G. 2000. The value of wetlands: importance of scale and landscape setting. *Ecological Economics*. 35 (1). 25-33.
- Mitsch, W. J., Gosselink, J. G. 2015. *Wetlands*. Fifth edition. John Wiley and Sons. Hoboken, NJ. ISBN: 978-111-8676-820.
- Moldan, B. 2015. *Podmaněná planeta. Druhé, rozšířené a upravené vydání*. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. V Praze. ISBN: 978-80-246-2999-5.
- Moore, P. D. 2006. *Wetlands*. 2006. Chelsea House. New York. ISBN: 978-081-6053-247.
- Mugwedi, L. F., Goodall, J., Witkowski, E. T. F., Byrne, M. J. 2014. The role of reproduction in *Glyceria maxima* invasion. *African Journal of Range*. 32 (1). 59-66.
- Murkovic, M. 2016. *Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis*. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. 346.
- Odland, A., del Moral, R. 2002. Thirteen years of wetland vegetation succession following a permanent. *Plant Ecology* [online]. 162 (2). 185-198. [cit. 2017-02-19].

- Oliveira, C. S., Alcantara, G. B., Lião, L. M., Mesquita, G. M., Freitas, S. S., Petacci, F. 2016. Decomposition Dynamics of *Typha angustifolia* under Aerobic Conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*.
- Pandey, V. C., Singh, N., Singh, R. P. 2014. Rhizoremediation potential of spontaneously grown *Typha latifolia* on fly ash basins: Study from the field. *Ecological Engineering*
- Reddy, K., D'Angelo, E. 1997. Biogeochemical indicators to evaluate pollutant removal efficiency in constructed wetlands. *Water Science and Technology*. 35 (5). 1-10.
- Rejmánková, E. 2015. Phenolic content and growth of wetland macrophytes: Is the allocation to secondary compounds driven by nutrient availability? *Folia Geobotanica*. 51 (3). 239-250.
- Rodriguez-Hernandez, M. C., García De la-Cruz, R. F., , E. 2017. *Typha latifolia* as potential phytoremediator of 2,4-dichlorophenol: Analysis of tolerance, uptake and possible transformation processes. *Chemosphere*. 173.
- Romero, J. A., Brix, H. 1999. Interactive effects of N and P on growth, nutrient allocation and NH₄ uptake kinetics by *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*. 64 (3-4).
- Řepka, R., Grulich, V. 2014. *Ostřice České republiky: terénní obrazový průvodce*. Lesnická práce. Kostelec nad Černými lesy. ISBN: 978-80-7458-066-6.
- Sarma, K. S., Rogers, S. M. D. 2000. Plant regeneration from seedling explants of *Juncus effusus*. *Aquatic Botany*. 68 (3). 239-247.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS*. 1999. 152.
- Snyder, J. M., Rejmánková, E. 2015. Macrophyte root and rhizome decay: the impact of nutrient enrichment and the use of live versus dead tissue in decomposition studies. *Biogeochemistry*. 124 (1-3). 45-59.
- Stashenko, E., Ren, J. 2014. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. *Advances in Gas Chromatography*. InTech.
- Sumczynski, D., Bubelova, Z., Sneyd, J., Erb-Weber, S., Mlcek, J. 2015. Total phenolics, flavonoids, antioxidant activity, crude fibre and digestibility in non-traditional wheat flakes and muesli. *Food Chemistry*. 174. 319-325.

- Vymazal, J. 1995. Čištění odpadních vod v kořenových čistírnách. ENVI. Třeboň.
- Vymazal, J. 2002. The use of sub-surface constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic: 10 years experience. *Ecological Engineering*. 18 (5). 633-646.
- Vymazal, J., Kröpfelová, L. 2005. Growth of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic. *Ecological Engineering*. 25 (5). 606-621.
- Zhou, Z., Chen, X., Zhang, M., Blanchard, C. 2014. Phenolics, flavonoids, proanthocyanidin and antioxidant activity of brown rice with different pericarp colors following storage. *Journal of Stored Products Research*. 59. 120-125.

Internetové a ostatní zdroje:

- AOPK: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR: Souhrn doporučených opatření pro evropsky významnou lokalitu Březnice - Oblouček [online]. 2016 [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <http://drusop.nature.cz/>
- Běloky: obec Běloky: Územní plán Běloky 2012. Oficiální stránky obce Běloky © 2017 [online] [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <http://www.obec-beloky.cz/uredni-deska/uzemni-plan-obce-beloky>
- ČGS: Česká geologická služba: Geologická mapa 1:50 000. © 2014 Česká geologická služba [online]. [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: http://mapy.geology.cz/geocr_50/
- Mapy Google: Google. [online]. Mapová data © 2017. GeoBasis – DE/BKG (© 2009). [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <https://www.google.cz/maps>
- MŽP: Ministerstvo životního prostředí: Ramsarská úmluva o mokřadech [online]. [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: http://www.mzp.cz/cz/ramsarska_umluva_o_mokradech
- Pokorný, J. 2004: Úloha mokřadů v regulaci hydrologické bilance a biogeochemických cyklů v krajině. Ústav ekologie krajiny Akademie věd České republiky. ENKI o.p.s. [online]. [cit. 2011-05-05] Dostupné z: http://www.eamos.cz/amos/kek/externi/kek_407/02/02.htm.
- Ramsarská úmluva. 1971. Úmluva o mokřadech majících mezinárodní význam především jako biotopy vodního ptactva. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Ramsar, Iran.

- URL1: FSV CVUT. Mokřady [online]. [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: http://storm.fsv.cvut.cz/data/files/p%C5%99edm%C4%9Bty/TOK1/TOK1_2015_12_mokrady_bez_obr.pdf
- URL2: SCIRPUS SYLVATICUS. 2007. BOTANY.CZ [online]. Copyright © www.botany.cz; 2007-2017 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/scirus-sylvaticus/>
- URL3: Glyceria maxima. 2007. BOTANY.CZ [online]. Copyright © www.botany.cz; 2007-2017 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/glyceria-maxima/>
- URL4: JUNCUS EFFUSUS. 2007. BOTANY.CZ [online]. Copyright © www.botany.cz; 2007-2017 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/juncus-effusus/>
- URL5: Phragmites australis. 2007. BOTANY.CZ [online]. Copyright © www.botany.cz; 2007-2017 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/phalaris-arundinacea/>
- URL6: Juncus effusus. 2015. NatureSpot [online]. Copyright © www.naturespot.org.uk; [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://www.naturespot.org.uk/species/reed-sweet-grass>

Seznam tabulek a obrázků

Seznam tabulek:

Tabulka č. 1: Fenolické látky ve vybraných potravinách rostlinného původu (Giada, 2013)	30
Tabulka č. 2: Porovnání množství fenolických látek v mokřadních rostlinách měřený metodou FC (Rejmánková, 2015)	31
Tabulka č. 3: Zkoumané lokality v ČR	38
Tabulka č. 4: Harmonogram prací na rok 2016.....	38
Tabulka č. 5: Tabulka pro přípravu kalibračních roztoků v mg/l.....	40

Seznam obrázků:

Obrázek č. 1: Distribuce sluneční energie v odvodněné krajině a v krajině zásobené vodou (URL 1)	13
Obrázek č. 2: Transport kyslíku do nezaplavené a zaplavené půdy a pasivní difuze. (Brix, 1993).....	15
Obrázek č. 3: Transformace a koloběh uhlíku v mokřadech (Reddy et D'Angelo, 1997)..	17
Obrázek č. 4: Rákos obecný (foto Rottová, 2016)	19
Obrázek č. 5: Chrastice rákosovitá (foto, URL5).....	21
Obrázek č. 6: Ostřice obecná (foto Rottová, 2016).....	21
Obrázek č. 7: Orobinec na břehu řeky Chrudimky v Horním Bradle (vlevo), v Praze na Hloubětíně (vpravo) Třeboň (dole), (foto Rottová, 2016).....	23
Obrázek č. 8: Skřípina lesní (foto URL2).....	24
Obrázek č. 9: Zblochan vodní (foto URL6)	25
Obrázek č. 10: Sítina rozkladitá (foto URL4)	26
Obrázek č. 11: Vztah mezi primárními a sekundárními metabolity (Giada, 2013).....	27
Obrázek č. 12: Hlavní třídy polyfenolických látek, (Bravo, 1998).	28
Obrázek č. 13: Klasifikace flavonoidů, (Bravo, 1998).....	30
Obrázek č. 14: Výzkumné lokality v přehledu mapy České republiky (zdroj, Mapy Google), kde 1 - Běloky, 2,3 – Louňovák a Pařez, 4 – Horní Bradlo, 5 – Chmelná, 6 – Březnice a 7 – Moraveč.	36
Obrázek č. 15: Odběr nadzemní biomasy na lokalitě Horní Bradlo (foto Rottová, 2016)..	38
Obrázek č. 16: Extrakce a odstředění vzorků (foto Rottová, 2016)	40

Obrázek č. 17: Reakce činidla se vzorky (foto Rottová, 2016).....	41
Obrázek č. 18: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Phragmites australis</i> na různých lokalitách	43
Obrázek č. 19: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Carex nigra</i> na různých lokalitách, písmena značí statisticky významný rozdíl na 95 % hladině významnosti.	44
Obrázek č. 20: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Typha latifolia</i> na různých lokalitách	45
Obrázek č. 21: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Scirpus sylvaticus</i> na různých lokalitách	45
Obrázek č. 22: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Juncus effesus</i> na různých lokalitách.....	46
Obrázek č. 23: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Glyceria maxima</i> na různých lokalitách	47
Obrázek č. 24: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Phalaris arundinacea</i> na různých lokalitách.....	47
Obrázek č. 25: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Scirpus sylvaticus</i> v průběhu období od června do prosince 2016 z lokalit Březnice, Chmelná, Moraveč a Pařez.....	48
Obrázek č. 26: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Phalaris arundinacea</i> v průběhu období od června do prosince 2016 z lokalit Březnice, Běloky, Moraveč a Horní Bradlo.	49
Obrázek č. 27: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase <i>Typha latifolia</i> v průběhu období od června do prosince 2016 z lokalit Březnice, Běloky a Chmelná.....	49
Obrázek č. 28: Průměrná koncentrace celkových fenolických látek v nadzemní biomase sedmi druhů makrofyt sklizených ze sedmi lokalit v červnu 2016, písmena značí statisticky významný rozdíl na 95 % hladině významnosti.	50