

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenviromentální chemie a výživy rostlin



**Biologicky aktivní látky v rostlinách rostoucích na půdě
kontaminované rizikovými prvky**

Diplomová práce

Bc. Klára Nejdlová

Výživa zvířat a dietetika

prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.

Dr. Şebnem Kurhan

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Biologicky aktivní látky v rostlinách rostoucích na půdě kontaminované rizikovými prvky jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 23. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc. za skvělé vedení práce, vysvětlení problematiky celého pokusu, a především na ohromnou pomoc při psaní celé práce. Dále Dr. Šebnem Kurhan, která mi jako odborný konzultant velmi pomohla, provedla mě metodikou části pokusu a velmi pomohla se zpracováním výsledků. Dále bych chtěla poděkovat mým rodičům a příteli za jejich plnou podporu během celého studia.

Biologicky aktivní látky v rostlinách rostoucích na půdě kontaminované rizikovými prvky

Souhrn

V rámci dlouhodobě probíhajícího pokusu, založeného v roce 2008, v oblasti Příbramska blízko Kovohutí Příbram, který se zabývá fytoremediací této lokality pomocí dvou druhů dřevin: vrb (*Salix* spp.) a topolů (*Populus* spp.), byl proveden odběr vzorků několika druhů rostlin s cílem zjistit, jaký je v nich obsah sledovaných rizikových prvků. Zároveň byly odebrány vzorky půdy z pokusných polí pro stanovení obsahu rizikových prvků přímo v půdě. Dalším cílem experimentu bylo posoudit reakci rostlinného metabolomu na obsahy těchto prvků v rostlinách. Každý z odebraných druhů rostlin (pampeliška lékařská, řebříček obecný, lipnice obecná a třezalka skvrnitá) se běžně vyskytuje na celém území ČR a bývá součástí diety řady hospodářských zvířat, a to formou pastvy nebo jako součást sena či travní senáže. Tři ze sledovaných rostlin jsou navíc léčivé byliny. Léčivé byliny jsou byliny hojně využívané především ve farmacii a kosmetice, ale v biologickém zemědělství se uvažuje i o jejich terapeutickém využití u hospodářských zvířat. Obsahy prvků v půdě byly stanoveny technikou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES). Na zájmové lokalitě byl v půdě zvýšený obsah kadmia (Cd) a olova (Pb) a zinku (Zn), mezi další sledované rizikové prvky patří chrom (Cr), měď (Cu) a nikl (Ni). V rostlinách byly zaznamenány zejména zvýšené obsahy kadmia, kdy nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v případě třezalky skvrnité. Nespecifická analýza obsahových látek v rostlinách byla provedena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem QTOF (kvadrupól - time of flight). Všechna získaná chromatografická data byla korelována s jejich obsahem rizikových prvků v příslušných rostlinách. Ve všech vzorcích byly výsledky korelace filtrovány podle vysoké korelační hodnoty, mezní bod byl korelační koeficient hodnoty $r = 0,9/-0,9$. Látky, které silně korelovaly s příslušnými rizikovými prvky byly převedeny do grafů a ty byly poté porovnány. Byly zaznamenány rozdíly jak mezi jednotlivými druhy rostlin, tak i mezi jednotlivými prvky. Obsah rizikových prvků v mnohých případech pozitivně ovlivnil obsah biologicky aktivních látek v rostlinách zejména v případě esenciálních a rostlinám prospěšných prvků, jako je Cu, Cr a Ni. Naopak v případě Cd, Pb a Zn reagoval rostlinný metabolom převážně negativně. Následujícím krokem dalšího výzkumu by pak měla být identifikace a kvantifikace těch látek, které byly přítomností sledovaných prvků ovlivněny nejvíce.

Klíčová slova: rizikové prvky, příjem rostlinami, biologicky aktivní látky, LC-QTOF, léčivé byliny.

Biologically active compounds in plants growing at the risk element contaminated soil

Summary

This work is a part of long-term experiment, established in 2008, in the Příbram region near Kovohutě Příbram, which deals with phytoremediation of this locality using two species of fast growing trees: willows (*Salix* spp.) and poplars (*Populus* spp.). Several plant species were sampled to see the content of monitored risk elements that was in them. At the same time, samples of soil from the experimental fields were taken as well to see content of these risk elements in the soil. Another goal was to assess the response of the plant metabolome to this higher contents of risk elements in plants. Each of the collected plant species (common dandelion, common yarrow, rough bluegrass, St. John's wort) is commonly found throughout Czech Republic and is part of common diet of livestock, in the form of pasture or as part of hay or grass silage. Three of these plant species are medicinal herbs. Medicinal herbs are widely used in pharmacy and cosmetics, they are also considered for therapeutic use in organic livestock husbandry.

The contents of elements in soil were determined by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES). At the locality of interest, the soil content of cadmium (Cd), lead (Pb) and zinc (Zn), other monitored risk elements include chromium (Cr), copper (Cu) and nickel (Ni). In plants, increased levels of cadmium were recorded, highest values have been reported for St. John's wort. Non-specific analysis of constituents in plants was performed by combined high performance liquid chromatography with a high-resolution mass spectrometer Q-TOF (quadrupole - time of flight). All obtained chromatographic data were correlated with their content of risk elements in plants. In all samples, the correlation results were filtered by high correlation values, the cut-off point was the correlation coefficient $r = 0.9 / -0.9$. Substances that strongly correlated with the relevant risk elements were transferred to the charts and these were then analysed. Differences were recorded both between each of the plant species and between each of the elements. Higher content of risk elements had a positive effect on the content biologically active substances in plants in many cases, mainly in the case of essential elements and elements beneficial for plants such as Cu, Cr and Ni. In case of Cd, Pb and Zn, on the other hand, the plant metabolome reacted mostly negative. The next step in further research should be the identification of quantification of those substances which were most affected by the presence of the monitored elements.

Keywords: risk element, uptake by plants, biologically active compounds, LC-QTOF, medicinal herbs.

Obsah

Úvod	8
Vědecká hypotéza a cíle práce	9
Přehled literatury	10
Zkoumané byliny	10
Pampeliška lékařská - <i>Taraxacum</i> sect. <i>Ruderalia</i>	10
Botanické zařazení	10
Název	11
Popis	11
Použití	12
Lipnice obecná - <i>Poa trivialis</i> L.	13
Botanické zařazení	13
Název	13
Popis	13
Třezalka skvrnitá - <i>Hypericum maculatum</i> L.	14
Botanické zařazení	14
Název	14
Popis	14
Použití	15
Řebříček obecný - <i>Achillea millefolium</i> L.	16
Botanické zařazení	16
Název	16
Popis	16
Použití	17
Biologicky aktivní látky	17
Biologicky aktivní látky v pampelišce lékařské	18
Biologicky aktivní látky v třezalce skvrnité	18
Biologicky aktivní látky v řebříčku obecném	19
Rizikové prvky	19
Kadmium (Cd)	20
Chrom (Cr)	21
Měď (Cu)	22
Nikl (Ni)	23
Olovo (Pb)	24
Zinek (Zn)	25

Právní regulace maximálních přípustných obsahů	26
Materiál a metody	27
Zájmová lokalita	27
Odběr a skladování vzorků půd a rostlin	29
Stanovení rizikových prvků v půdách a rostlinách	30
Analýza obsahu biologicky aktivních látek	30
Příprava vzorků	30
Chromatografická analýza	31
Zpracování dat a statistické vyhodnocení	32
Detekce dat v XCMS Online	32
Vícerozměrná analýza v MetaboAnalyst	32
Výsledky	34
Obsah rizikových prvků v půdě a rostlinách	34
Výsledky vícerozměrné analýzy	36
řebříček obecný (<i>Achillea millefolium</i>)	36
třezalka skvrnitá (<i>Hypericum maculatum</i>)	38
lipnice obecná (<i>Poa trivialis</i>)	40
pampeliška lékařská (<i>Taraxacum</i> sect. <i>Ruderalia</i>)	42
Výsledky korelací	45
řebříček obecný (<i>Achillea millefolium</i>)	45
třezalka skvrnitá (<i>Hypericum maculatum</i>)	47
lipnice obecná (<i>Poa trivialis</i>)	49
pampeliška lékařská (<i>Taraxacum</i> sect. <i>Ruderalia</i>)	52
kořen	52
listy	54
Diskuze	56
Závěr	59
Literatura	60

1 Úvod

V rámci dlouhodobě probíhajícího pokusu, založeného v roce 2008, v oblasti Příbramska blízko Kovohutí Příbram, který se zabývá fytoremediací této lokality pomocí dvou druhů dřevin: vrb (*Salix* spp.) a topolů (*Populus* spp.), byl proveden odběr vzorků několika druhů rostlin za cílem zjistit, jaký je v nich obsah sledovaných rizikových prvků. Fytoremediace patří mezi metody, které mohou ekologicky šetrným způsobem odstranit nebo stabilizovat kontaminant v prostředí (například rizikový prvek v půdě) pomocí rostlin (Favas et al. 2014). Kromě obsahu prvků bylo také zjišťováno, zda tyto prvky nějakým způsobem, pozitivním či negativním, ovlivňují obsah biologicky aktivních látek v těchto rostlinách.

Každý z odebraných druhů rostlin (pampeliška lékařská, řebříček obecný, lipnice obecná a třezalka skvrnitá) se běžně vyskytuje na celém území ČR a bývá součástí diety řady hospodářských zvířat, a to formou pastvy nebo jako součást sena či travní senáže. Tři ze sledovaných rostlin jsou navíc léčivé byliny. Léčivé byliny jsou byliny hojně využívané především ve farmacii a kosmetice. Jedná se o rostliny sbírané z planých porostů ve volné přírodě nebo pěstované. Obsahují množství účinných látek, k léčení jsou využívány již od počátku našeho letopočtu a velmi pravděpodobně ještě před ním (Jirásek & Starý 1989).

Léčivé byliny se dají považovat za slibnou alternativu pro léčbu hospodářských zvířat v ekologickém zemědělství. Poptávka po produktech ekologického zemědělství stále stoupá, Mayer et al. (2014) uvádějí, že v roce 2014 byla poptávka po těchto produktech 170krát vyšší než před deseti lety. Kromě úplné náhrady léků by se léčivé byliny daly využít například i pro podporu léčby antibiotiky a snížit tak míru jejich užívání u hospodářských zvířat (Ayrle et al. 2016).

Biologicky aktivní látky jsou ty, které nějakým způsobem ovlivňují život organismů. Téměř všechny existující látky jsou více či méně biologicky aktivní (Štulík 2006). Množství aktivních látek v rostlinách závisí na podmínkách prostředí. Složení fytochemikálií rostlin závisí na použitém kultivaru, klimatických a geografických podmínkách, kvalitě půdy, metodě pěstování a sklizně, tudíž může být v každé várce jiné (Ayrle et al. 2016).

Na počátku pokusu byla některá z remediačních polí ošetřena čistírenským kalem (SS) nebo kompostem (Co), cílem tohoto ošetření bylo zjistit, zda zlepší podmínky pro fytoextrakci rizikových prvků tím, že usnadní růst stromům.

Pro kontrolu obsahu rizikových prvků v půdě byl v době odběru vzorků rostlin vždy odebrán i vzorek půdy z každého z pokusných polí.

Odebrané vzorky rostlin byly analyzovány na množství obsahu rizikových prvků a také byla provedena chromatografická analýza pro zjištění obsahu biologicky aktivních látek v jednotlivých vzorcích. Výsledky těchto dvou analýz byly poté korelovány, z výsledků korelací rizikových prvků a obsahu aktivních látek poté vyšlo najevo zda a jak rizikové prvky ovlivňují obsah těchto látek.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Příjem rizikových prvků (Cd, Pb, As apod.) rostlinami je ovlivněn celou řadou faktorů, zejména obsahem těchto prvků v půdě a fyzikálně-chemickými vlastnostmi této půdy, které významným způsobem dostupnost prvků rostlinám ovlivňují. Významnou roli hraje, ale také rostlina jako taková. Některé druhy používají mechanismy omezující příjem kovů do rostlin i při velmi vysoké koncentraci. Další druhy pak nemají žádný specifický ochranný mechanismus a velmi citlivě reagují na zvýšené koncentrace rizikových prvků. Třetí skupinou rostlin jsou pak akumulátory, které jsou vybaveny mechanismem detoxikace, který jim umožní akumulovat ve své nadzemní biomase rizikové prvky bez zjevných symptomů fytotoxicity těchto prvků. Zastoupení těchto skupin rostlin např. v lučním porostu pak může ovlivnit příjem prvků pasoucími se hospodářskými nebo volně žijícími zvířaty. Do detoxikačních procesů v rostlině se zapojují

i biologicky aktivní látky, jako fenolické sloučeniny, flavonoidy, terpenoidy apod., které jsou i důležitými složkami výživy zvířat. Tyto látky se mohou podílet na detoxikaci prvků (např. jejich imobilizací), ale na druhé straně je složení a kvalita biologicky aktivních látek v rostlinách přítomností rizikových prvků ovlivněna. Cíl práce je tedy následující: Na vybraném souboru druhů rostlin rostoucích na půdě kontaminované Cd a Pb posoudit případné změny v zastoupení biologicky aktivních látek v závislosti na druhu rostliny a obsahu rizikových prvků (zejména Cd).

Hypotéza: specifické biologicky aktivní látky v rostlinách interagují s rizikovými prvky v závislosti na druhu rostliny

3 Přehled literatury

3.1 Zkoumané byliny

Ze spektra druhů bylin, které se vyskytují na zájmové lokalitě, byla vybrána skupina druhů, které se běžně vyskytují na celém území a mohou být tedy běžnou součástí diety jak volně žijících býložravců, tak i hospodářských zvířat. Při výběru druhů byl také kladen důraz na to, aby se jednalo o druhy s vysokým obsahem účinných látek, soustředili jsme se tedy na léčivé rostliny. Pro srovnání byl vybrán i zástupce lipnicovitých, kde můžeme očekávat nižší zastoupení obsahových látek, ale jedná se o významnou složku píce pro krmení hospodářských zvířat.

V pokusu byly tedy použity tři léčivé byliny - pampeliška lékařská, třezalka skvrnitá, řebříček obecný, a jedna tráva - lipnice obecná.

Léčivé byliny jsou byliny hojně využívané především ve farmacii a kosmetice. Jedná se o rostliny sbírané z planých porostů ve volné přírodě nebo pěstované. Obsahují množství účinných látek, k léčení jsou využívány již od počátku našeho letopočtu a velmi pravděpodobně ještě před ním (Jirásek & Starý 1989).

Léčivé byliny se dají považovat za slibnou alternativu pro léčbu hospodářských zvířat v ekologickém zemědělství. Poptávka po produktech ekologického zemědělství stále stoupá, Mayer et al. (2014) uvádějí, že v roce 2014 byla poptávka po těchto produktech 170krát vyšší než před deseti lety. Kromě úplné náhrady léků by se léčivé byliny daly využít například i pro podporu léčby antibiotiky a snížit tak míru jejich užívání u hospodářských zvířat (Ayrle et al. 2016).

Trávy jsou nejvíce rozšířenou čeledí cévnatých rostlin na naší planetě, především v mírném a subtropickém podnebném pásu. Jedná se o čeleď morfologicky velmi rozmanitou (Skoumalová & Hrouda 2018). Jedná se o zemědělsky nejdůležitější rostliny pro výživu lidí - pšenice, žito, ječmen, oves, kukuřice, rýže a další, i zvířat - bojínek, jílek, psárka a další; obilniny i píce jsou pro účely výživy lidí i zvířat odedávna intenzivně šlechtěny (Opatrná & Součková 2003).

3.1.1 Pampeliška lékařská - *Taraxacum sect. Ruderalia*

Botanické zařazení

Říše: Plantae - rostliny

Oddělení: Magnoliophyta - rostliny krytosemenné

Třída: Rosopsida - vyšší dvouděložné rostliny

Řád: Asterales - hvězdnicotvaré

Čeleď: Asteraceae - hvězdnicovité

Rod: *Taraxacum* - pampeliška

Název

Český název: smetánka lékařská, pampeliška lékařská, pampeliška smetánka

Latinský název: *Taraxacum sect. Ruderalia* (dříve *Taraxacum officinale*)

Anglický název: Common dandelion

Slovenský název: Púpava lekárska

Druhy rodu *Taraxacum* vykazují velkou variabilitu v biologii a morfologii. Zatímco v Severní Americe je tento rod brán jako jeden druh s velkou fenotypovou variabilitou,

v Evropě je považován za rod s početným zastoupením různých druhů. Názory jednotlivých autorů na tento rod se velmi různí (Steward-Wade et al. 2002). Jednotlivé druhy jsou pak od sebe těžko rozlišitelné (Zicha 2012). V současné době *Taraxacum sect. Ruderalia* odpovídá bylině dříve označované jako *Taraxacum officinale*. Zicha (2012) uvádí, že označení *Taraxacum officinale* je označení pro severské druhy pampelišek, které je pro střeoevropské druhy nevhodné. Sekce *Taraxacum sect. Ruderalia* je velmi málo zmapovaná a velmi obsáhlá sekce pampelišek, v ČR do ní spadá asi 250 druhů.

Popis

Jedná se o vytrvalou bylinu produkující množství mléka. Listy tvoří přizemní růžici, kde se každý šestý list překrývá (Steward-Wade et al. 2002). Vyskytuje se téměř všude, na loukách, pastvinách, trávnících a u cest, často je považována za obtížný plevel (Jirásek & Starý 1989). Tvar listů je obvejčitý až kopinatý, většinou jsou listy hluboce zastříhované kracovitě laločnaté, méně pak jen odděleně vykrajované, či zubaté, volně zúžené u řapíku (Pilát & Ušák 1974). Výrazná prostřední žilka listu má barvu od světle žluto-zelené až po sytou červeno-hnědou. Silný kuželovitý kořen může mít až 2-3 cm v průměru a až jeden až dva metry do hloubky, postranní kořínky jsou spirálovitě rozmístěné více či méně rovnoměrně po celé délce kořene (Steward-Wade et al. 2002).

Bezlisté stvolky vyrůstají, někdy i ve větším počtu, z listové růžice a dorůstají výšky 5 až 50 centimetrů. Na každém stvolu roste vždy jeden úbor o velikosti 3-5 cm, zákrovní listeny mají sytě zelenou barvu, vnější listeny odstávají nebo jsou nazpět ohnuté, vnitřní jsou přitisklé k úboru. Kvítky úboru jsou jazykovité se zlatožlutou korunou protaženou v pentlicovitý nebo jazykovitý útvar, ten bývá vně načervenalý (Pilát & Ušák 1974). Květy pampelišky jsou obojaké, tyčinky souprašné a semeník je jednopouzdrý, spodní ze dvou plodolistů (Jirásek & Starý 1989). Plod pampelišky je nažka šedé nebo tmavě hnědé barvy, v horní polovině je opatřena hrbolky, zúžená směrem nahoru, kde přechází v tenký zobánek s chmýrem na konci (Pilát & Ušák 1974). Až 90 % druhů pampelišek je polyploidních a rozmnožuje se pomocí obligátní apogamie, tudíž převážně nepohlavně, zbylých 10 % je diploidních, ty se rozmnožují pohlavně (Steward-Wade et al. 2002). Semena dobře klíčí na povrchu půdy a do 1 cm hloubky,

v půdě klíčivost ztrácí a v hlubší půdě nevyklíčí vůbec, schopnost vyklíčit mají 5-14 dní po uzrání (Molata 2009). Pampelišku můžeme vidět na Obrázku 1.



Obrázek 1. *Taraxacum* sect. *Ruderalia*

Dlouhý (1902)

Použití

Jako droga se z pampelišky používá hlavně kořen, případně kořen s listy, stonky a nevykvetlými poupaty. Sběr kořene probíhá od jara do podzimu, kořen s natí lze sbírat na jaře (Jirásek & Starý 1989). Komerčně je využíván suchý extrakt získaný 70 % ethanolem v poměru 5-7:1 z nati s kořeny, ty se sbírají na jaře krátce před kvetením (Opletal 2016). Kořen je používán pro léčbu gastrointestinálního traktu, podporuje trávení a funkci jater, listy jsou užívány jako diuretikum a na podporu trávení (Amin Mir et al. 2013), mezi další využití patří léčba některých ženských nemocí jako je rakovina prsu a dělohy (Jeon et al. 2008). Intenzivní výzkum pampelišky ale prokázal další účinky pampelišky: může účinkovat při potlačení zánětu, jako diuretikum, stimulant trávení, stimulant produkce inzulínu, ochrana sliznice gastrointestinálního traktu, prebiotikum, imunomodulátor apod. Uvádí se také, že může mít antiangiogenní a antineoplastické účinky a podílet se tak na potlačení nádorového bujení, avšak ne všechny studie se na těchto účincích shodují (Amin Mir et al. 2013). Pampeliška je také součástí některých bylinných směsí

z tradiční čínské medicíny, konkrétně směsi s antibiotickými účinky, směsi pro léčbu žloutenky typu B, a ve směsi pro udržení funkce žaludečního a střevního epitelu (Yarnell & Abascal. 2009). Kvalita drogy je určena obsahem kyseliny kávové, kdy je požadováno množství nad 0,02 % této látky v sušině (Liu et al. 2015).

3.1.2 Lipnice obecná - *Poa trivialis* L.

Botanické zařazení

Říše: Plantae - rostliny
Oddělení: Magnoliophyta - rostliny krytosemenné
Třída: Liliopsida - jednoděložné
Řád: Poales - lipnicotvaré
Čeleď: Poaceae - lipnicovité
Rod: Poa – lipnice

Název

Český název: lipnice obecná, lipnice pocestní
Latinský název: *Poa trivialis*, *Poa attica*
Anglický název: Rough bluegrass, rough-stalked meadow-grass
Slovenský název: lipnica pospolitá

Popis

Jedná se o vytrvalou travu výběžkatou, dorůstající výšky 30-100 cm. Jako u všech trav je stonkem článkované stéblo s nody, tedy kolénky, a internody. Stéblo je pevně obejmuto listovou pochvou (Skoumalová & Hrouda 2018). Lodyha je drsná, listy taktéž a jsou tmavě zelené barvy, někdy i s fialovým nádechem, vybíhající do špičky. Jazyček listu je 4-10 mm dlouhý. Lata je vejčité jehlancovitá, klásky matně zelené až nařiaovělé obsahují 2-4 květy (Chinery 1998). Roste na vlhkých loukách, v příkopech, mokřadech, na březích vod a v lužních lesích. Kvete od května do června (Skoumalová & Hrouda 2018). Lipnice je vyobrazena na Obrázku 2.



Obrázek 2. *Poa trivialis*

(<https://alchetron.com/cdn/poa-trivialis-7e4c337f-22da-441e-89e1-d595bd170c6-resize-750.jpeg>)

3.1.3 Třezalka skvrnitá - *Hypericum maculatum* L.

Botanické zařazení

Říše: Plantae - rostliny
Oddělení: Magnoliophyta - rostliny krytosemenné
Třída: Rosopsida - vyšší dvouděložné rostliny
Řád: Malpighiales - malpighiotvaré
Čeleď: Hypericaceae - třezalkovité
Rod: *Hypericum* - třezalka

Název

Český název: třezalka skvrnitá, čarovník, svatojánská bylina
Latinský název: *Hypericum maculatum*, *Hypericum androsaemifolium*
Anglický název: imperforate St John's-wort
Slovenský název: Ľubovník škvrnitý

Popis

Třezalka skvrnitá je 20-60 centimetrů vysoká, lysá rostlina, na lodyze jsou 4 úzké podélné lišty, tím se liší od známější třezalky tečkované (*H. perforatum*), která má lišty pouze 2 a navíc také rozdílný tvar kalichů. Má husté páry celokrajných listů. Květenství je nahloučené, květy třezalky jsou zlato-žluté, mají asi 2-3 centimetry v průměru, mají velký počet tyčinek a semeník se 3 čnělkami. Kališní lístky jsou široké a tupé a na okrajích chybí stopkaté žlásky. Korunní lístky jsou z vnější strany černě tečkované a čárkované. Plodem je červená až červenohnědá tobolka. Roste na slunných částečně chráněných stanovištích, která nejsou příliš vlhká, na složení půdy příliš nezáleží, často roste v souvislých porostech, může se stát i druhem extenzivním a vytlačovat ostatní. Vyskytuje se na horských loukách, pastvinách, okrajích lesů, prameništích a někdy i na volných plochách v parkových smrčínách (Soják et al. 1983). Třezalku můžeme vidět na Obrázku 3.



Obrázek 3. *Hypericum maculatum*

(http://www.biolib.de/batava/band18/high/IMG_9008.html)

Použití

Třezalka skvrnitá má na rozdíl od třezalky tečkované nižší obsah léčivých látek. Tmavé tečky na květech třezalek jsou rozpustné v alkoholu a dávají červené barvivo, to se v minulosti užívalo k barvení látek (Soják et al. 193). Jako droga se užívá rozkvetlá nať, bez spodní zdřevnatělé části, nemá pach a chuť je mírně hořká a svíravá. Vnitřně je užívána proti řadě nemocí nervového původu - deprese, melancholie, nervové vyčerpání, dále je užívána proti poruchám zažívacího

a vylučovacího ústrojí. Zevně se dá použít k rychlejšímu hojení ran a bércových vředů. Je také součástí některých komerčně vyráběných léčiv (Jirásek & Starý 1989). Často způsobuje citlivost na sluneční světlo tzv. hypericismus, u zvířat především na málo pigmentovaných částech těla, a u světlých typů lidí. Při nadměrném množství třezalky v pastvě dobytka dochází k načervenalému zabarvení mléka (Soják et al. 1983). Fotodermatitidy se mohou objevit při dlouhodobém užívání extraktů z třezalky v množstvích 2000-4000 mg denně (Opletal 2016).

3.1.4 Řebříček obecný - *Achillea millefolium* L.

Botanické zařazení

Říše: Plantae - rostliny

Oddělení: Magnoliophyta - rostliny krytosemenné

Třída: Rosopsida - vyšší dvouděložné rostliny

Řád: Asterales - hvězdnicotvaré

Čeleď: Asteraceae - hvězdnicovité

Rod: *Achillea* - řebříček

Název

Český název: Řebříček obecný, myší chvost, husí jazýček, krupička, krvavník, zajecí chléb, žebřík, Achillova bylina

Latinský název: *Achillea millefolium*, *Alitubus millefolium*, *Chamaemelum millefolium* a mnoho dalších synonym

Anglický název: Common yarrow

Slovenský název: Rebríček obyčajný

Popis

Řebříček je silně aromatická, vytrvalá rostlina rostoucí na stráních, suchých loukách, pastvinách a u cest. Jeho převážně bílé květy jsou opylovány hmyzem (Sulborska & Weryszko-Chmielewska 2006). Lodyhy řebříčku jsou jednoduché, přímé a tuhé, rostlina dorůstá výšky 15 až 120 cm. Lodyha je bohatě listnatá a převážně lysá. Listy rostou střídavě s podlouhle až čárkovitě kopinatou čepelí, 2krát až 3krát peřenosečnou, s různě členitými a tvarovanými úkrojky. Květenství je chocholičnatá lata, poměrně bohatá, složená z drobných úborů, s plevkatým lůžkem a střechovitým zákrovem. Má dva druhy květů: obojaké, v terči paprscité s trubkovitou korunou, špinavě bílé barvy, kromě pestíku. Květy se srostlými obaly jsou samičí, v paprsku jazykovité

s bílou až sytě růžovou korunou. Tyčinky jsou souprašné a semeník je u obou typů jednopouzdrý, spodní složený ze dvou plodolistů. Plod řebříčku je zploštělá, podlouhlá nažka stříbrošedé barvy bez chmýru (Jirásek & Starý 1989). Řebříček je vyobrazen na Obrázku 4.



Obrázek 4. *Achillea millefolium*

Dlouhý (1902)

Použití

Jako droga se z řebříčku sbírá kvetoucí nat' nebo jen květenství, bez spodní zdřevnatělé části. Chuť a vůně je aromatická, kořená a nahořklá. Účinnou složkou řebříčku je převážně silice, její složení je podmíněno geneticky. Účinkuje protizánětlivě a proti křečím (Jirásek & Starý 1989), dále má hemostatické a koagulační účinky (Si et al. 2006). Užívá se v nálevu nebo jako součást čajů, a to při poruchách trávení a problémech se žlučníkem (Jirásek & Starý 1989), dále také proti horečce a nachlazení (Si et al. 2006), zevně se užívá v koupelích na vředy a další špatně se hojící rány. U citlivých jedinců může vyvolat vyrážky nebo závratě (Jirásek & Starý 1989).

3.2 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky jsou ty, které nějakým způsobem ovlivňují život organismů. Téměř všechny existující látky jsou více či méně biologicky aktivní (Štulík 2006). Množství aktivních látek v rostlinách závisí na podmínkách prostředí. Složení fytochemikálií rostlin závisí na použitém kultivaru, klimatických a geografických podmínkách, kvalitě půdy, metodě pěstování a sklizně, tudíž může být v každé várce jiné (Ayrle et al. 2016).

V rostlinách rozeznáváme produkty primárního a sekundárního metabolismu. Primární metabolismus probíhá ve všech živých organismech, kdy jeho produkty jsou především aminokyseliny (a následně peptidy a proteiny), mastné kyseliny (tuky) a sacharidy, tyto základní živiny slouží jako energetický zdroj a stavební jednotky organismu, dále dávají za vznik dalším metabolitům, které energetickou či stavební funkci nemají, ale uplatňují se

významně ve fyziologických procesech organismu (enzymy). Do skupiny primárních metabolitů je třeba dále zahrnout také sloučeniny, které se bezprostředně podílejí na biochemických procesech buněk (kyseliny dýchacího řetězce, nukleotidy apod.) a vitamíny (Opletal 2010). Sekundární metabolity jsou produkty metabolických drah, které probíhají pouze v jistých fázích růstu rostliny, nebo pouze v daných pletivech či skupinách buněk. Produkty sekundárního metabolismu se u různých druhů liší. Nesou různé funkce, které se liší. Může se jednat o přenašeče informací, efekторы dalších organismů, faktory odpovídající na ekologickou situaci nebo formy uskladnění odpadních látek primárního metabolismu (Musilová et al. 2012). Mají širokou škálu účinku od účinků terapeutických až po toxické. Běžně se vyskytují v potravinách a krmivech, kde jsou často bohužel nepovšimnuty, ačkoliv mají velký potenciál cíleného využití. Sekundární metabolity rostlin jsou nízkomolekulární, nevzniká na ně tudíž rezistence mikroorganismů, neohrožují tedy životní prostředí ani se v něm nehromadí a jejich zdroje jsou obnovitelné (Opletal & Šimerda 2009).

3.2.1 Biologicky aktivní látky v pampelišce lékařské

Mezi nejvýznamnější látky zastoupené v pampelišce patří především seskviterpenové laktony a kyseliny s esterově vázanou β -D-glukosou, ty se vyznačují pro pampelišku charakteristickou hořkou chutí a mají protizánětlivé a protirakovinné účinky. Obvykle je zařazujeme jako glykosidy a v pampelišce se nachází například taraxakosid, dihydrolaktucin a ixerin. Dále pampeliška obsahuje fenylypropanoidy, z řad derivátů kyseliny skořicové, se schopností modulovat zánět, dále také obsahuje triterpeny (karotenoidy, fytosteroly, tetracyklické terpeny a pentacyklické alkoholy), flavonoidy a polysacharidy, především značné množství inulinu v kořeni. Spilková et al. (2016) uvádějí, že obsah inulinu je nejvyšší na podzim, kdy ho kořen obsahuje až 40 %, naopak na jaře klesá až na 1-2 %. Z minerálních látek je v pampelišce, především v jejích listech, bohatě zastoupen draslík: uvádí se, že v listech může obsah draslíku dosahovat až 4 %, to znamená, že ve 100 gramech listu se nachází až 297 mg tohoto minerálu. Množství draslíku přijaté z tinktur a výluhů z pampelišky je však klinicky zanedbatelné (Yarnell & Abascal 2009). Kromě toho obsahují listy pampelišky vysoký obsah vitamínu C (0,1 mg na gram listu), v květech je obsažen vitamin B₂ (Spilková et al. 2016). Liu et al. (2015) pak uvádějí, že pampeliška obsahuje také vitamin A a D.

3.2.2 Biologicky aktivní látky v třezalce skvrnité

V nati třezalky lze najít řadu účinných látek, z nichž nejznámější je hypericin patřící mezi naftodianthrony, jejich nejvyšší obsah je v květech a poupatech. Hypericin byl dříve považován za hlavní sedativní složku třezalky. Naftodianthrony také vykazují antivirotické a antibakteriální účinky. Další skupinou jsou flavonové a flavonolové deriváty především glykosidů kvercetinu (kvercitrin, hyperosid a další). Mezi další aktivní látky patří floroglucinové deriváty (např. hyperforin a adhyperforin), jejichž nejvyšší obsah je ve zralých plodech a jsou společně s naftodianthrony považovány za hlavní účinné složky třezalky. Hyperforin a adhyperforin jsou modulatory účinku

serotoninu, tyto účinky hrají hlavní roli v antidepresivním užití této byliny. Některé studie pak ukazují i potenciální anxiolytický účinek extraktu z třezalky, takže může pomoci při překonávání strachu a úzkosti. Dále v této rostlině nacházíme xanthony, nejhojněji zastoupené v kořenech, dále proanthocyanidiny a třísloviny, vyskytující se především v nadzemní biomase mimo květy, silice, fenolkarboxylové kyseliny a vosky (Opletal 2016).

3.2.3 Biologicky aktivní látky v řebříčku obecném

Řebříček obsahuje silici (0,05-0,25 %) a množství monoterpenových uhlovodíků, především vysoký obsah chamazulenu. Jeho obsah se různí dle chemických variant řebříčku, může být až 40 %, varianty s vysokým obsahem chamazulenu mohou mít až 5krát více proazulenů než květy heřmánku (Spilková et al. 2016). V rostlinách řebříčku dále nalezneme monoterpenové epoxidy, bicyklické monoterpeny (kafr), seskviterpenové laktony (achillicin), monoterpenové epoxidy (cineol) a flavonoidy. Flavonoidy, achillicin chamazulen a cineol vykazují protizánětlivé a antiinvazní účinky (Opletal & Skřivanová 2010).

3.3 Rizikové prvky

Babička (2017) připomněl definici toxické látky podle Paracelsa (1492-1541), která zní: “Všechny sloučeniny jsou jedy, neexistuje sloučenina, která by jedem nebyla. Rozdíl mezi lékem a jedem tvoří přijatá dávka.” Striktní rozlišení látek toxických a prospěšných je v obecném povědomí silně zakořeněno, je však neopodstatněné a zavádějící. Jedná se spíše o různé stupně toxicity v závislosti na dávce, která způsobuje v různé míře poškození organismu (Linhart 2012).

Minerální látky, tedy chemické prvky, hrají významnou roli v průběhu metabolických procesů. Dělí se na nepostradatelné (esenciální), postradatelné (neesenciální) a toxické. Toto rozdělení je podmíněno různými faktory a kupříkladu každý nepostradatelný prvek se může stát toxickým, je-li v organismu zastoupen v příliš vysoké koncentraci. Esenciální prvky dělíme dále na makroprvky a mikroprvky, přičemž jejich zastoupení v organismu je poměrně stálé. Rizikové prvky (či nepříliš přesně těžké kovy) jsou prvky, které běžně nalézáme v prostředí v různých množstvích v závislosti na lokalitě a jejich využití člověkem. Rizikové prvky není možné z přírody snadno odstranit, nejsou degradovatelné, proto nastává problém, pokud jsou jejich obsahy v prostředí z jakéhokoliv důvodu příliš vysoké (Prasad 2004). Minerální složení rostlin je variabilní mezi druhy, ale i v rámci druhu a je ovlivněno zejména půdním typem, fyzikálně, chemickými vlastnostmi půdy, dostupností prvků v půdě a dalšími faktory, jako je například přítomnost mykorrhizy (Prasad 2004). Dále je složení rostlin ovlivněno podnebím a počasím, hnojením, vegetační fází apod. (Zeman 2006). Fišer et al. (2014) uvádějí, že velké množství rostlin rostoucích na lokalitách s vysokým obsahem rizikových prvků má mechanismy pro omezení vstupu kovů do rostliny nebo také účinné mechanismy detoxikace kovů v kořenech s minimálním přenosem kovů do nadzemní biomasy rostliny. Fišer et al.

(2014) dále uvádějí, že také existují hypertolerantní druhy rostliny, které se nazývají hyperakumulátory, ty aktivně pohlcují rizikové prvky v půdy do nadzemních částí rostliny a tam je akumulují v mnohem vyšších koncentracích (100 až 1000 krát) oproti ostatním druhům rostlin, tyto hyperakumulátory nejčastěji detoxikují kovy vazbou jejich iontů na ligand a uložením ve vakuolách buněk.

Z prvků zkoumaných v rámci této práce patří Zn, Cu, Ni a Cr mezi prvky pro zvířata i člověka esenciální, tedy nezbytné pro zajištění nezbytných biologických funkcí organismu. Pb a Cd patří mezi prvky toxické, tudíž mezi prvky, které ve své základní podobě, nebo v podobě sloučenin vykazují toxické účinky, a to zejména formou inhibice metabolismu enzymů (Babička 2017). Výběr prvků souvisí s charakteristikou kontaminace zájmové lokality (viz níže).

3.3.1 Kadmium (Cd)

Kadmium je bílý kov, vlastnostmi podobný zinku, chemicky je s ním těsně spojen a většina sloučenin zinku v komerčním využití obsahuje nízké zastoupení kadmia (Babička 2017). Goering et al. (1995) uvádějí, že světová produkce kadmia se pohybuje okolo

17 000 tun ročně, světové emise sloučenin kadmia do atmosféry se pohybují okolo 7000 tun ročně, převážně z antropogenního využití kadmia. V přírodě se přirozeně vyskytuje jen velmi omezeně, v zemské kůře se vyskytuje v obsahu asi 0,15-0,2 mg/kg, tím se řadí na 67. místo v zemské kůře (Kunzová et al. 2015).

Vyrábí se elektrolýzou nebo frakční destilací ze zinečnatých rud, které doprovází. Reaguje s halogeny, sírou a dalšími nekovy, na vzduchu shoří na oxid kademnatý (Kunzová et al. 2015). Do ovzduší se dostává zejména těžbou rud, které kadmium obsahují, a jejich následným zpracováním (Babička 2017), do vody se dostává z odpadních vod a hnojiv, ze kterých se dostává také do půdy. Obršálová (2002) uvádí, že aplikací hnojiv se do půdy dostane až 0,639 g/ha kadmia na rok. Nebezpečné jsou také úniky kadmia z podniků nakládajících s nebezpečnými odpady (Kunzová et al. 2015). Využívá se zejména ve formě jeho solí, například ve výrobě nikl-kadmiových baterií,

k pokovování, jako stabilizátor při výrobě plastů a jako pigment v barvách (Goering et al. 1995).

Nejvýznamnějšími zdroji kadmia pro lidský organismus jsou potrava a cigarety (Goering et al. 1995); některé zemědělské plodiny, jako například pšenice, sója a tabák, mají zvýšenou schopnost akumulovat Cd. Mezi akumulátory kadmia můžeme zařadit také vyšší houby, především hřibovité. Dalším významným akumulátorem kadmia, využívaným ve výživě člověka, jsou tzv. mořské plody, tedy krabi, mušle a ústřice (Babička 2017), dále pak játra a ledviny hospodářských zvířat, jak je vysvětleno dále (Goering et al. 1995).

Ke vstřebávání kadmia v lidském a zvířecím organismu dochází z 5 % ve střevech, ale až z 25-50 % v plicích. Po absorpci se kadmium rychle ukládá do orgánů, přibližně 50

% kadmia je uloženo v játrech a ledvinách, z jater se pomalu transportuje do ledvin, kde je ho obvykle vyšší koncentrace. Koncentrace kadmia v tkáních se při soustavném příjmu

v průběhu života zvyšují, protože organismus ho neumí rychle detoxikovat a vyloučit (Goering et al. 1995). S detoxikací rizikových prvků v organismu pomáhají tzv. metalothioneniny (MT). Jedná se o nízkomolekulární, intracelulární proteiny, obsahující cystein, a díky němu mají tyto sloučeniny vysokou schopnost vázat kovy. Metalothioneniny se podílí na transportu, skladování a detoxikaci kovů a také vychytávání volných radikálů. Tvorba komplexů MT-kov chrání tělo před akutní otravou rizikovými prvky a největší afinitu mají ke kadmiu, olovu, stříbru, rtuti a platině (Raduenská et al. 2012). Setrvání kadmia v lidském organismu je odhadováno na 10-30 let. Vyšší dávky kadmia způsobují vysoký krevní tlak, poškození ledvin a reprodukčních orgánů, destrukci červených krvinek, křehnutí kostí, to může vést až ke zborcení skeletu, může také vyvolávat rakovinu plic, zejména u kuřáků (Babička 2017).

3.3.2 Chrom (Cr)

Chrom je tvrdý stříbrný kov s modrým nádechem, je málo reaktivní. Lze ho vyleštit do vysokého lesku a odolává oxidaci na vzduchu díky ochranné oxidové vrstvě, která se tvoří na povrchu. V přírodě se vyskytuje ve více minerálech, nejčastěji však jako chromit, který je také těžen. Ročně se vytěží 24 milionů tun chromitu, přičemž hlavními producenty jsou Jižní Afrika (10 mil. tun), Indie (5 mil. tun), Kazachstán (3,5 mil tun) a Turecko (1,5 mil tun). Globální rezervy chromitu jsou odhadovány na 800 milionů tun. Hlavní využití chromu je jako přídavek do nerezové oceli, kde je ho až 15 %, dále k pochromování. Další využití chromu je jako průmyslový katalyzátor, a v různých sloučeninách se užívá jako titrační činidlo, v koželužnictví, dříve se používal v pigmentech pro barvení plastů, gumy, dlaždic a podlahových krytin (Emsley 2011).

Chrom je esenciálním prvkem pro zvířata i člověka, v těle napomáhá při regulaci hladiny glukózy. Denní příjem chromu se pohybuje okolo 0,02-0,1 mg. Zvířata s nedostatkem chromu v dietě mohou trpět lehkým diabetem, u lidí k deficienci dochází velmi zřídka. Mezi potraviny bohaté na chrom patří ústřice, játra, vaječný žloutek, arašídý, pivovarské kvasnice, melasa a pšeničné klíčky (Emsley 2011).

Chrom se vyskytuje ve dvou základních valenčních stavech a to trojmocný a šestimocný: zatímco Cr^{3+} je esenciální, Cr^{6+} ve formě chromových solí je velmi toxický a karcinogenní. Bylo zjištěno, že trojmocný chrom může být v těle oxidován pomocí peroxidů na šestimocný, proto není přídavek trojmocného chromu do doplňků stravy ve vysokých koncentracích možné považovat za zcela benefiční.

Pracovníci v průmyslu pracující s chromem a jeho sloučeninami, mají vysokou predispozici ke vzniku tzv. chromových vředů. Při tomto onemocnění dochází k poškození kůže, které odhaluje maso pod kůží a silně svědí. Vystavení chromanům také vede ke vzniku žaludečních vředů (Emsley 2011).

Kontaminace prostředí chromem se vyskytuje zřídka a obvykle v důsledku znečištění z koželužen a jiného průmyslového odpadu. Rozpustné chromové soli jsou navíc v půdě postupně redukovány na méně rozpustné trojmocné soli, které jsou pak nedostupné pro rostliny (Emsley 2011).

3.3.3 Měď (Cu)

Měď je kov oranžovo-zlaté barvy, patří do skupiny přechodných kovů, je kujný a tažný s velmi dobrou elektrickou vodivostí. Je odolný vůči vzduchu a vodě, ale ne proti kyselinám. Vyskytuje se v jednomocné a dvoumocné variantě, Cu^{2+} je z nich stabilnější. Měď je ve formě žlutého chalkopyritu, zeleného malachitu, kupritu a azuritu těžena v povrchových dolech po celém světě, roční produkce činí až 16 milionů tun a největší producenti mědi jsou Chile (5,5 mil. tun), USA (1,2 mil. tun), Peru (1,2 mil. tun) a Čína (1 mil. tun). Vedlejšími produkty při těžbě mědi jsou zlato a stříbro. Měď se využívá zejména v oblasti elektroniky (až 60 % celkového průmyslového využití mědi), dále ve stavebnictví na střechy a instalatérský materiál, dále se využívá jako teplovodivý materiál a ve slitinách (bronz, mosaz). Měď je také používána v malém množství do vody, aby se předešlo růstu vodních řas a sinic, které jsou na zvýšené hodnoty tohoto prvku ve vodě zvláště citlivé. Má bakteriostatické účinky a používá se často v nemocnicích na klikách dveří. Babička (2017) také zdůrazňuje její využití v podobě měďnatých solí v zemědělství a ve farmacii (Emsley 2011).

Měď je esenciálním prvkem pro všechny druhy živočichů i rostlin, je součástí více než 10 enzymů. Potrava v našich podmínkách obvykle obsahuje dostatek mědi, navíc ji může obsahovat i pitná voda, je-li přiváděna měděnými trubkami a ohřívána v zásobnících

z mědi (Emsley 2011). Babička (2017) uvádí, že koncentrace Cu ve vodě mohou být od 1,6 až do 300 mg/kg, takové koncentrace ale mohou být příčinou nevolnosti a závratí po vypití vody. V případě, že tělo přijímá nadbytek mědi, může docházet k vytlačování železa a zinku, jelikož měď má do určité míry schopnost je nahrazovat (Emsley 2011). Naopak nedostatek mědi narušuje metabolismus železa, což může vést k narušení syntézy hemoglobinu a následné anémii (Babička 2017). Denní příjem Cu u dospělého člověka by měl být okolo 1,2 mg mědi, kojící ženy potřebují 1,5 mg (Emsley 2011). Babička (2017) uvádí tolerovaný denní příjem mědi 0,5 mg/kg tělesné hmotnosti. Lidé na dietě s nízkým obsahem mědi trpí vysokým obsahem cholesterolu, vysokým krevním tlakem a narušeným trávením glukózy. Mezi jídla bohatá na měď patří ústřice, krabi a humři, dále maso (kachní, jehněčí, vepřové a hovězí), mandle, vlašské ořechy, slunečnicová semínka, houby a otruby.

V nadbytku má měď toxické účinky, při nadměrné konzumaci mědi obvykle dochází k zvracení, které má zabránit akutní otravě (Emsley 2011). Vysoké koncentrace mědi

v těle způsobují řadu problémů, měď se totiž v těle hromadí, a to především v játrech a kostní dřeni. Měďnaté rozpustné soli, například běžně používaný síran měďnatý, způsobují anemii, poškození jater a ledvin a také krvácení do zažívacího traktu. Chronická akumulace mědi je souhrnně označována jako Wilsonova nemoc, dochází k poškození a funkční nedostatečnosti jater, ledvin, mozku a oční rohovky (Babička 2017, Emsley 2011).

V přírodě není měď příliš mobilní, soustřeďuje se ve vrchních vrstvách půdy, kde je vázána na anorganické částice a organickou hmotu. Ztráty mědi v půdě jsou částečně doplňovány mědí v atmosféře, dále je měď do půdy doplňována postřiky a hnojením. Rostliny přijímají měď relativně snadno, ale většina se ukládá v kořenech. Měď vázaná na proteiny je důležitá pro fotosyntézu, distribuci sacharidů a pro produkci DNA a RNA. Měď také pomáhá rostlinám s odolností vůči nemocem, plodiny rostoucí na půdě chudé na měď produkují méně semen. Pravidelná sklizeň na polích z půdy odebírá až 30 gramů mědi na hektar a rok (Emsley 2011).

3.3.4 Nikl (Ni)

Nikl je světle stříbrný lesklý kov, je tažný a kujný, je odolný vůči oxidaci, ale ne vůči kyselinám. Má feromagnetické vlastnosti. Většina niklu dostupná v přírodě je původem z vesmíru a na Zemi se dostal spadem meteorů. Nikl ze Země je nedostupný v tekutém zemském jádru. Velké množství niklu je rozpuštěno v mořích. Ve sloučeninách se nejčastěji se vyskytuje jako dvojmocný. Nikl má vysokou afinitu k síře, a tak je můžeme v přírodě často najít společně ve formě sulfidů. Babička (2017) také uvádí, že se kromě síry vyskytuje i s antimonem a arsenem. Nikl je těžen ve více jak 20 zemích, jeho roční produkce činí

1 500 000 tun. Mezi největší producenty niklu patří Rusko (300 tis. tun), Kanada (250 tis. tun), Indonésie (190 tis. tun), Austrálie (190 tis. tun), Nová Kaledonie (125 tis. tun) a Kolumbie (100 tis. tun). Zhruba polovina vyprodukovaného niklu je každoročně použita ve slitinách, například v nerezové oceli. Ta se typicky skládá ze železa s 18 % chromu a 8 % niklu. Poddajnost niklu ho umožňuje natahovat do tenkých drátů

a svou odolnost vůči korozi má i za vysokých teplot, proto se používá i v plynových turbínách a raketových motorech. Dále je nikl využíván k pokovování, průmyslové katalýze, v bateriích a k výrobě mincí.

Nikl je u některých organismů esenciálním prvkem, a je spojen s růstem organismu. Zda je nebo není esenciálním pro lidský organismus není známo, pokud ano tak ve velmi malých množstvích. Zdá se, že nikl může být součástí enzymů. Například u bakterie *Streptomyces* byl Ni prokázán jako součást superoxid dismutázy, což je enzym se schopností přeměňovat superoxidové radikály na méně nebezpečné molekuly peroxidu vodíku a vody. Mezi potraviny bohaté na nikl patří některé druhy fazolí a také čaj.

V těle se nikl váže na albumin a s ním putuje po těle. Většina niklu se hromadí v plicích, ledvinách a játrech, přebytečný nikl je vylučován močí (Emsley 2011).

Prach z niklu vznikající při jeho zpracování může způsobovat rakovinu plic nebo rakovinu sliznice nosu a úst. Při kontaktu s kůží může nikl způsobovat dermatitidy, ty mohou přecházet až v chronické ekzémy. V případě chronických otrav niklem dochází k poškození myokardu, ledvin a centrálního nervového systému (Babička 2017).

Znečištění půd niklem může být výraznější oproti vodám s vyšším negativním dopadem. Zdrojem znečištění jsou metalurgické, chemické a elektrochemické provozy, a navíc také spalovny odpadu (Babička 2017).

Tolerance rostlin k vyšším obsahům niklu se různí dle druhu, a zatímco některé rostliny (např. oves) vysoké koncentrace tolerují, jiné (např. kukuřice) tyto koncentrace nesnesou

a uhynou. Mezi rostlinnými druhy najdeme takové, které mají vysokou schopnost přijímat a akumulovat některý z rizikových prvků. Takové rostliny nazýváme hyperakumulátory

a dosud nejvyšší počet hyperakumulátorů byl popsán právě v případě niklu (Prasad a de Oliveira Freitas 2003). Například *Hybanthus floribundus* je rostlina, která snáší extrémně vysoké koncentrace niklu, dokáže ve svých listech a stonku hromadit množství niklu odpovídající až 0,6 % hmotnosti suché hmoty, mohla by proto v budoucnu sloužit jako způsob dekontaminace půd a zároveň sloužit jako zdroj dostupného niklu (Emsley 2011).

3.3.5 Olovo (Pb)

Olovo je měkký stříbrno-šedivý kov, je dobře kujný i při pokojové teplotě, je odolný vůči oxidaci na vzduchu a vůči vodě. Sloučeniny olova jsou nejčastěji dvojmocné a čtyřmocné. Má čtyři přirozeně se vyskytující izotopy a všechny jsou radioaktivní. Nejčastěji se vyskytuje ve formě galenitu a anglesitu, tyto rudy jsou těženy, ročně se vytěží 4 miliony tun olova, a to převážně v Číně (40 %), Austrálii (20 %), USA (10 %) a Peru (10 %). Většina olova je recyklována, například ze starých baterií, tímto způsobem je získáno až

5 milionů tun olova ročně. V minulosti bylo olovo hojně využíváno v barvách, při výrobě insekticidů, v barvách na vlasy a jako aditivum pro zvýšení oktanového čísla benzínu. Ve starověku bylo využíváno ke stavbě viaduktů a lodí. V současné době je olovo využíváno zejména při výrobě baterií pro vozidla. Mezi další využití olova se řadí například výroba odstředivých plátů, pigmenty, výroba projektilů, výroba závaží na činky, výroba zátěžových pásů pro potápěče, výroba ochranných obleků proti radiaci (Emsley 2011).

Množství olova, které je v malém množství obsaženo v zemské kůře, se dostalo do půdy díky lidské aktivitě. Množství člověkem vypuštěného olova v prostředí je vyšší, než u jakéhokoliv jiného kovu (Emsley 2011).

Olovo nemá žádnou biologickou roli v organismu, některé mikrobiální kmeny se ale přizpůsobily a zvládnou žít v prostředí vysoce kontaminovaném olovem. Pro všechny ostatní organismy včetně lidí se jedná o kumulativní jed. O nepříznivém účinku olova

na organismus věděli již staří Řekové. Část olova se dostává do potravinového řetězce, protože rostliny ho umějí vstřebávat a ukládat a s nimi se olovo dostává dále do potravinového řetězce. Rostliny zvládnou absorbovat poměrně vysoké množství olova, než to začne ovlivňovat jejich růst (Emsley 2011). Většina olova z potravy ale projde tělem nevstřebaná, v trávicím traktu se vstřebává jen asi 5 % olova obsaženého v potravě. Olovo je z velké části nevstřebatelné a nerozpustné díky jeho sloučeninám se sírou a fosforem (Emsley 2011). Světová zdravotnická organizace stanovila tolerovaný týdenní příjem olova na 20 µg/kg tělesné hmotnosti. Ve většině přírodních vod se obsah olova pohybuje okolo 5 µg/l a vyhláška pro pitnou vodu uvádí nejvyšší mezní hodnotu jako 10 µg/l. Problém může nastat v soukromých studních, kde může být obsah lokálně vyšší (Babička 2017). Olovo se v lidském organismu chová jako antagonist vápníku. Přijaté olovo se kumuluje v kostech a narušuje tvorbu krve, protože naruší syntézu hemoglobinu.

V období deficitu vápníku se olovo z kostí uvolňuje a putuje do krevního oběhu, poté působí toxicky na další orgány těla, nejčastěji poškozuje játra, ledviny a orgány reprodukční soustavy. Mezi další následky otravy olovem patří tzv. saturnismus (koliky, delirium až úplná paralýza), u dětí způsobuje mentální retardaci, má karcinogenní účinky, dále má schopnost prostupovat placentou a způsobovat poškození nervové soustavy plodu a potraty. Organické sloučeniny olova se rozpouští v tucích a mají neurotoxické účinky; mohou se navíc absorbovat pokožkou (Babička 2017).

3.3.6 Zinek (Zn)

Zinek je namodralý bílý kov, na vzduchu reaguje a tvoří na povrchu povlak. Nejčastěji se objevuje jako dvojmocný. Nejdůležitější zinečnatou rudou je sfalerit, ale existuje řada dalších, jako například smisonit nebo wurzit. Roční produkce zinku činí 11 mil. tun, největší producenti jsou Čína (3 mil. tun), Austrálie (1,5 mil. tun), Peru (1,4 mil. tun), USA (800 tis. tun) a Kanada (600 tis. tun). Zinek je komerčně využíván pro galvanizování oceli, dále se využívá v bateriích a slitinách. Zinek se také používá při výrobě gumy a pigmentů.

Zinek je esenciální prvek většiny živých organismů, je součástí mnoha enzymů.

V rostlinách se obsah zinku liší v závislosti obsahu zinku v půdě. Dle hodnot Světové zdravotnické organizace je na světě až 2 mil. lidí s dietou deficientní na zinek. Navíc obilniny a fazole obsahují vyšší obsah kyseliny fytové, ta váže zinek do nerozpustných fytátů a tím se snižuje jeho dostupnost. Mezi potraviny bohaté na zinek patří ústřice, sýr, játra, hovězí maso, pšenice, vejce a mléko. Zinek se odjakživa používal k léčbě nejrůznějších problémů (Emsley 2011).

Alloway (1990) považuje obsah Zn v rostlinách 10-25 mg/kg za nízký, 26-150 mg/kg za normální, 151-400 mg/kg za mírně zvýšený a více než 400 mg/kg za toxický.

Dříve se sloučeniny zinku používaly jako krém chránící před sluncem. Léčiva se zinkem se užívaly proti nachlazení a chřipce. Zinek je též důležitý pro odbourávání alkoholu v těle (Emsley 2011).

Zinek je při styku s pokožkou dráždivý, výpary z horkého zinku způsobují bolesti

v krku, kašel a pocení. Tyto příznaky se stupňují, pokud je vystavení výparům silnější. Nadměrná konzumace zinku způsobuje zvracení, bolesti břicha, průjem a horečku (Emsley 2011).

Ke kontaminaci půdy zinkem dochází na místech, kde byl zinek těžen anebo zpracováván, nebo na půdách hnojených čistírenským kalem. Vstupy zinku do půdy jsou obvykle vyšší než jeho ztráty (Emsley 2011).

3.3.7 Právní regulace maximálních přípustných obsahů prvků v půdě a rostlině

Preventivní obsah rizikových prvků v zemědělské půdě je stanoven vyhláškou č. 153/2016 Sb., o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Hodnoty stanovené touto vyhláškou jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Preventivní hodnoty obsahů rizikových prvků v zemědělské půdě zjištěné extrakcí lučavkou královskou (mg/kg sušiny)

Kategorie půd	Preventivní hodnota (mg/kg)										
	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	V	Zn
Běžné půdy	20	2,0	0,5	30	90	60	0,3	50	60	130	120
Lehké půdy	15	1,5	0,4	20	55	45	0,3	45	55	120	105

(Vyhláška č. 153/2016 Sb.)

V krmivech jsou stanoveny maximální přípustné obsahy pro olovo a kadmium, kde je stanovena maximální přípustná hodnota v krmivech rostlinného původu 1 mg/kg kadmia a 40 mg/kg olova (SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2002/32/ES).

4 Materiál a metody

4.1 Zájmová lokalita

Příbramsko patří mezi lokality významně zatížené rizikovými prvky, zejména v důsledku těžby a zpracování olovených rud. Nejstarším písemným dokladem o existenci huti na Příbramsku je listina z roku 1311. Olovená ruda (galenit, sfalerit) zde byla po staletí těžena západně od Příbrami. V roce 1786 bylo započato s výstavbou nové hutě 2 km SZ od centra města, mezi vesnicemi Lhota a Nové Podlesí. Tato huť byla základem dnešní akciové společnosti Kovohutě Příbram. Z těžby a výroby stříbra se vyvinula postupně výroba olova, do roku 1973 ještě z domácích olovených koncentrátů a poté výhradně z olovených odpadů, zejména automobilových baterií. Mezi léty 1970 a 1982 produkoval závod emise v množství mezi 200

až 400 t Pb ročně (Rieuwerts et al., 1999, Ekologická ročenka, 2003). V současné době je podnik vybaven kvalitním odlučovacím zařízením, takže emise olova a dalších prvků byly minimalizovány.

Důlní a hutní činnosti v této oblasti významně ovlivnily zastoupení rizikových prvků v půdě, především Pb, Cd a Zn. Vysoký obsah rizikových prvků v půdě je umocněn i jejich zvýšeným obsahem v geologickém podloží. Kromě bezprostředního okolí zdroje znečištění (Kovohutě Příbram, a. s.) se vyskytuje vyšší koncentrace některých nežádoucích prvků i v naplaveninách v povodí Litavky, kde byly v dřívějších dobách soustředěny proplachovny rud. Zvýšený obsah olova v ovzduší a akumulace rizikových prvků v půdách a rostlinách má negativní vliv na výši a kvalitu zemědělské produkce (Vrubel et al., 1996). Rieuwerts et al. (1999) odebrali půdní vzorky na 61 lokalitách Příbramského regionu a data obsahů rizikových prvků a v lesních půdách našli obsahy přesahující 50 000 mg Pb/kg, 20 000 mg Zn/kg, a 50 mg Cd/kg.

Fytoremediace patří mezi metody, které mohou ekologicky šetrným způsobem odstranit nebo stabilizovat kontaminant v prostředí (například rizikový prvek v půdě) pomocí rostlin. Fytoextrakce je remediační metoda, která kontaminant z půdy odstraní použitím rostlin, které daný prvek akumulují v nadzemní biomase (Favas et al. 2014). Mezi perspektivními rostlinami, které akumulují zejména Cd a Zn, mají přední místo rychle rostoucí dřeviny, zejména vrby (*Salix* spp.) a topoly (*Populus* spp.) (Pulford a Dickinson, 2006). V blízkosti Kovohutí Příbram byl

v roce 2008 založen dlouhodobý fytoremediační pokus, kde je testována fytoextrakční schopnost dvou klonů z rodu *Salix* spp., tedy klon TORDIS (*S. schwerinii* × *S. viminalis*) × *S. viminalis*); klon S218 (*S. × smithiana*) a dva klony z rodu *Populus* spp. tedy klon J105 (*P. nigra* × *P. maximowiczii*) a klon WOLTERSON (*P. nigra*) (Kubátová et al 2018). Schéma pokusu ukazuje obrázek 5, kde barevné pásy ukazují rozmístění jednotlivých klonů vrby a topolů. Pro zvýšení účinnosti fytoextrakce byla vybraná políčka ošetřena čistírenskými kaly (SS), kompostem (Co), inokulací mykorrhizních hub (M) apod. Políčka označená C byla bez dalšího ošetření.

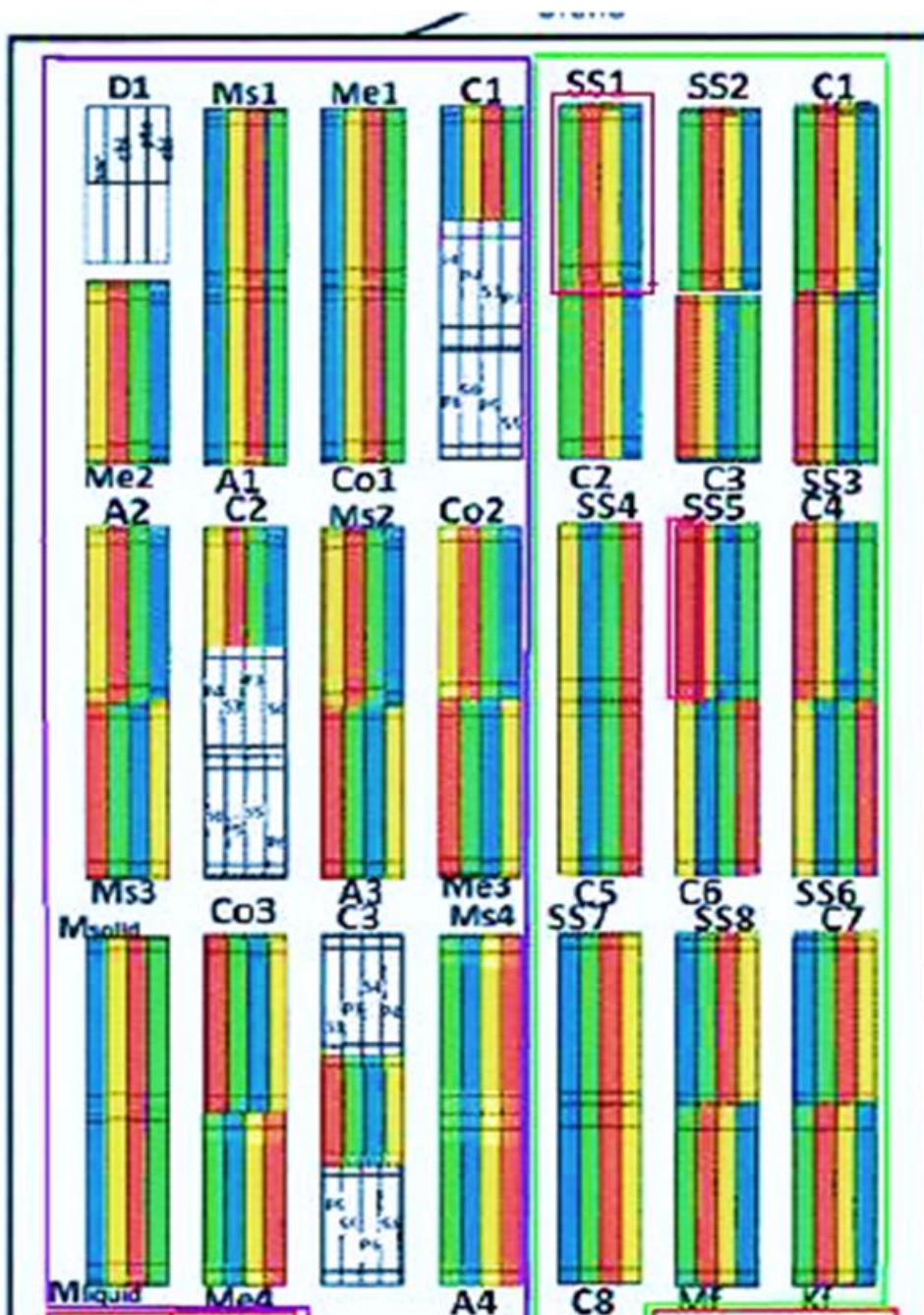
V rámci této práce byly na vybraných políčkách odebírány vzorky bylin (druhů zmíněných

v literárním přehledu), rostoucích pod těmito stromy, přičemž bylo sledováno, zda pěstování vrb

a topolů vedlo ke změně obsahu prvků v půdě a ve vybraných druzích rostlin a zda změna obsahu prvků v rostlinách povede ke změně obsahu biologicky aktivních látek v těchto rostlinách.

Byly tedy porovnány rostliny rostoucí na stanovištích bez vrb a topolů (K – kontrolní varianta) - odběr byl proveden v bezprostřední blízkosti pokusného pole), rostliny rostoucí na stanovištích pod vrbami a topoly bez dalšího ošetření (C), rostliny rostoucí pod vrbami a topoly na stanovištích ošetřených kompostem (Co) a rostliny rostoucí pod vrbami a topoly na stanovištích ošetřených čistírenským kalem (SS). V případě řebříčku obecného bylo třeba postupovat odlišně, tato rostlina neroste na zastíněných lokalitách, nevyskytovala se proto na políčkách s rostoucími vrbami

a topoly. Vzorky této rostliny byly tedy odebrány pouze na odběrovém místě K, a pro hodnocení případného vlivu obsahu rizikových prvků na obsah biologicky aktivních látek byly vzorky řebříčku odebrány také na lokalitě v blízkosti řeky Litavka, která se vyznačuje extrémně vysokými obsahy rizikových prvků v půdě (Vaněk et al. 2005). Tyto vzorky byly označeny zkratkou L. Schéma pokusné lokality je zobrazeno na Obrázku 5.



Obrázek 5. Schéma pokusného fytoředivačního pole

4.2 Odběr a skladování vzorků půd a rostlin

Odběr probíhal ve dvou fázích, první vzorky byly odebrány v květnu 2018, druhý odběr vzorků probíhal v červenci 2019. Z těla bylin byly sbírány pouze nadzemní části rostliny bez květu, tudíž stonek a listy, v případě pampelišky byl odebrán také kořen, jelikož se v pampelišce uvádí nejvyšší obsah biologicky aktivních látek právě v kořeni.

Vzorky byly po odběru převezeny do laboratoře a co nejdříve usušeny při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky pro pozdější analýzu namlety pomocí nožového laboratorního mlýnku (IKA A 11 basic). Namleté vzorky byly uschovány v laboratorním prostředí v papírových pytlících. Současně byly na příslušných políčkách odebrány reprezentativní vzorky půdy, které byly vysušeny při laboratorní teplotě, rozdrceny v třecí misce a prosety v sítu o velikosti ok 2 mm.

4.3 Stanovení rizikových prvků v půdách a rostlinách

Pro stanovení celkového obsahu prvků v půdě byly vysušené a proseté vzorky (aliquot 0,5 g) do reakčních teflonových nádob. Navážky byly poté zality 10 ml lučavky královské (směs koncentrované HCl a koncentrované HNO₃ v poměru 3:1). Reakční směs byla poté zahřívána v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem v zařízení Ethos 1 (MLS GmbH, Německo) po dobu 45 minut. Po částečném zchladnutí nádob byly ze vzorku odpařeny kyseliny a po úplném zchladnutí byly vzorky kvantitativně převedeny do 25 ml zkumavek a doplněny demineralizovanou vodou po rysku. Pro stanovení obsahu prvků v rostlinách bylo 0,5 g homogenizované biomasy naváženo do reakčních teflonových nádob a zality 8 ml 65% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku. Vzorky byly poté rozloženy mokřím rozkladem v uzavřeném systému, jak bylo popsáno v případě půd.

Pro prvkovou analýzu byla použita technika optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES) s axiální orientací plazmové hlavice na přístroji Agilent 720 (Agilent Technologies, Inc., USA) s využitím dvoukanálové peristaltické pumpy, mlžné komory typu StrumanMasters a pneumatického zmlžovače typu „V-groove“ vyrobeného z inertního materiálu. Podmínky měření byly následující: příkon do plazmatu 1.2 kW, průtok plazmového argonu 15.0 L/ min, průtok pomocného argonu 0.75 L/min, průtok argonu zmlžovačem 0.9 L/min.

4.4 Analýza obsahu biologicky aktivních látek

4.4.1 Příprava vzorků

Usušený rostlinný materiál byl připraven na analýzu fenolických látek dle postupu, který publikovali Rusalepp et al. (2017). Alikvót každého usušeného vzorku o hmotnosti 1g byl individuálně odvážen do 50 ml centrifugační zkumavky, do zkumavky bylo poté přidáno 10 ml rozpouštědla metanol (MeOH):voda (80:20, v/v). Zkumavky byly poté zakryty aluminiovou fólií, aby se zamezilo možné světelné degradaci fenolů, zkumavky byly dále umístěny do orbitální třepačky na extrakci při 200 otáčkách za minutu na 24 hodin.

Po skončení extrakce byly vzorky centrifugovány při 4600 otáčkách po dobu 15 minut při +4°C. Poměrná část o objemu 1 ml čistého supernatantu byla přesunuta do centrifugačních mikrozkušavek a uchována při -80 °C až do doby analýzy. Zmražení navíc odstraní většinu tuků extrahovaných společně s fenoly, stejně jako další komponenty s omezenou rozpustností v roztoku methanolu s vodou (EURL 2007). Tyto nepotřebné komponenty byly poté před analýzou odstraněny vysokorychlostní centrifugou (15000 otáček po dobu 10 min) a pro analýzu byl použit čistý supernatant.

4.4.2 Chromatografická analýza

UHPLC chromatografický systém Ultimate 3000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sestával z vysokotlaké binární pumpy, temperovaného autosampleru, degaseru mobilních fází a kolonového termostatu a byl spojený s HRAM hmotnostním spektrometrem Q-TOF Impact II (Bruker Daltonik, Bremen, Německo). Každý vzorek byl z důvodu rozdílné ionizovatelnosti jednotlivých skupin analytů měřen ve dvou systémech mobilních fází: 1) H₂O s 0,1% kys. mravenčí (fáze A) / MeOH (fáze B) a 2) H₂O s 5 mM mravenčanu amonného (fáze A) / MeOH (fáze B). Gradientová eluce byla shodná pro oba systémy fází: gradient začínal na 5 % fáze B (0 - 1,5 min),

poté se lineárně zvyšoval podíl fáze B na 70 % ve 25 min a následně na 100 % B ve 30 min, poté probíhal izokraticky 3 min a mezi 33 a 34 min pak klesl zpět na výchozích

5 % B, kde byl udržován do 40 min pro ekvilibraci systému. Pro chromatografickou separaci byla v obou případech použita kolona s reverzní fází (C18) Acclaim C18 (1.2 µm, 1.7x100 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) temperovaná na 40 °C při průtoku mobilní fáze 0,25 mL/min. Nastřikováno bylo vždy 5 µL vzorku.

Všechny vzorky byly měřeny v pozitivním i negativním módu ionizace v každém systému mobilní fáze. Parametry nastavení iontového zdroje byly pro oba módy nastaveny stejně (End Plate offset 500 V, napětí na kapiláře 2500 V, průtok dusíku zmlžovačem 2 Bar, průtok sušícího plynu 7 L/min, teplota sušícího plynu 350 °C). MS systém byl kalibrován pomocí referenčního roztoku na hmotnosti klastrů mravenčanu sodného na počátku každého měření daného vzorku v rozpětí monitorovaných iontových hmotností (50-1500 m/z). Sběr dat probíhal v módu Auto MS (data-dependentní MS/MS fragmentace daného iontu po dosažení určité limity jeho intenzity ve scanu). Frekvence skenování byla ve FullScan i MS/MS módu 0,5 Hz.

Každý vzorek byl v obou módech a každém systému fází měřen jako triplikát, mezi jednotlivými triplikáty bylo nastřikován čistý roztok rozpouštědel (MeOH/H₂O) (solvent blank), aby byla minimalizována a případně monitorována kontaminace mezi vzorky.

Po každých 10 nástřicích byl do analyzované sekvence zařazen vzorek kontroly kvality připravený jako směs všech vzorků měřeného rostlinného druhu. Měření bylo prováděno pomocí řídicích SW Q-TOF (ovládání MS spektrometru, Bruker Daltonik,

Bremen, Německo) a DC-MS Link Chromeleon (řízení UHPLC systému, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), které byly koordinovány nadstavbovým SW HyStar (Bruker Daltonik, Bremen, Německo). Hrubé dílčí vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo) a dále pak pomocí on-line softwarového balíku XCMS, verze 3.7.1. (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

4.4.3 Zpracování dat a statistické vyhodnocení

Zpracování dat se sestává z několika procedur pro vyhodnocení vlivu obsahu rizikových prvků na obsah fenolických látek ve všech rostlinách. Tento protokol postupů se sestává z extrakce podstatných dat ze souboru surových chromatografických dat na necílené metabolické profilování pomocí XCMS Online (verze 3.7.1.), včetně detekce vztahů, opravy retenčního času a zarovnání. Jako další krok byla provedena multivariační analýza dat detekovaných pomocí XCMS-online a to pomocí MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>); jedná se o webovou platformu. Nakonec bylo provedeno vyhodnocení korelací mezi vybranými kovy a aktivními látkami v Microsoft Excel 2019 verze 1808 (Microsoft Office Professional 2019, Microsoft Corporation, USA).

Detekce dat v XCMS Online

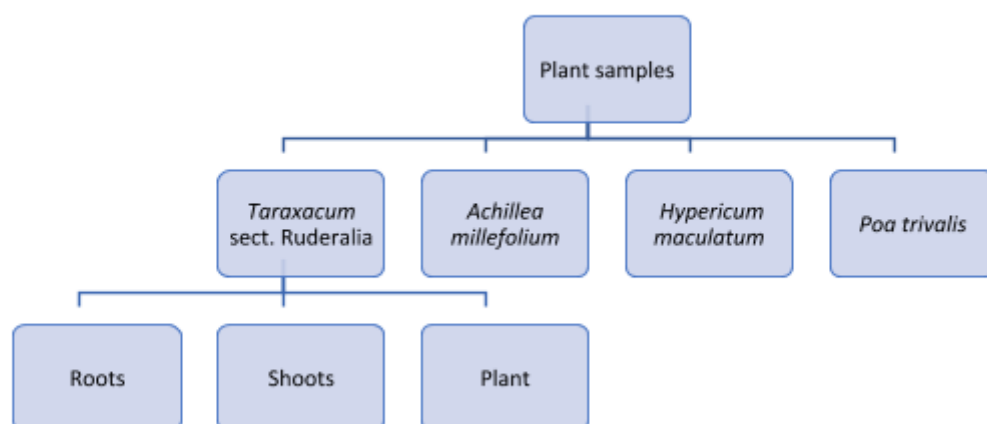
Nezpracovaná data z LC Q-TOF MS byla konvertována do formátu .mzXml pomocí export funkce v programu Gromelion (Thermo Scientific, USA). Jednotlivé .mzXml soubory byly poté nahrány na XCMS Online jako jeden dataset. Poté byl vytvořen tzv. “multigroup projekt” tak, aby byla zanalyzována každá skupina vzorků; byly vybrány individuální datasety vzorků z předchozího kroku a UPLC Bruker Q-TOF pozitivní mód definován jako odpovídající parametr úlohy. Úloha byla zadána a výsledný soubor sestává z celkového iontového proudu (TIC) před srovnáním retenčního času, dále z odchylky retenčního času od původního retenčního času, TIC po korekci retenčního času, cloudového vykreslování dat, vícerozměrného škálování (MDS) a analýzy hlavních komponent. Látky, které náležely do hmotnostní kalibrace (mezi 0-0,2 min) a látky post-gradientního programu (35 min), byly z výsledného listu vyjmuty. Vyfiltrovaná data byla normalizována podle skutečné počáteční váhy vzorků. Konečný seznam se sestává

z detekovaných frakcí látek a retenčního času, odpovídající oblasti všech frakcí u jednotlivých vzorků byly použity pro vícerozměrnou a korelační analýzu.

Vícerozměrná analýza v MetaboAnalyst

Výsledný seznam z XCMS Online v excelu byl zkonvertován do formátu .csv a nahrán do MetaboAnalyst bez přidání dalších filtrů. Data byla normalizována podle součtu,

transformována dle logaritmu (generalizovaná logaritmická transformace) a automatického škálování. Na data byla aplikována shluková analýza, euklidovská vzdálenost a algoritmus shlukování skupin. Analyzované proměnné znázorňuje Graf 1.



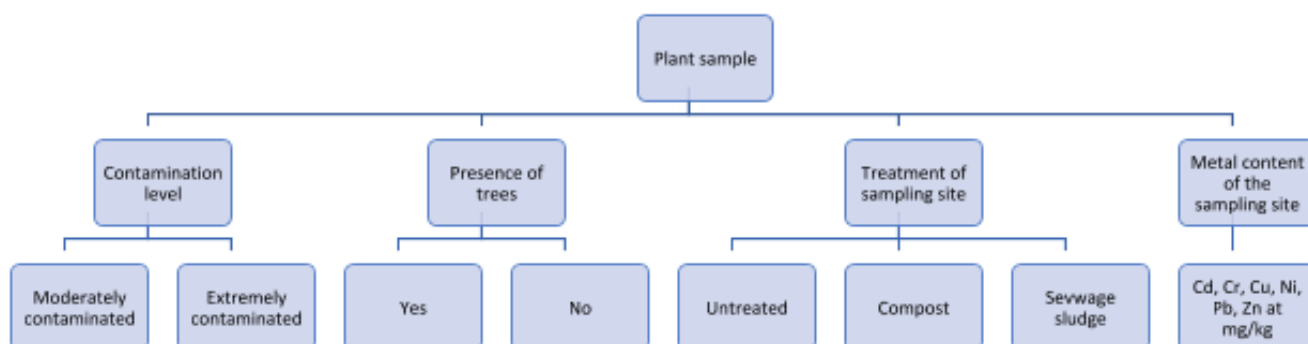
Graf 1. skupiny látek

Vzorky pro vícerozměrnou analýzu byly shlukovány do skupin dle úrovně kontaminace (v případě řebříčku obecného) nebo dle způsobu ošetření půdy (pampeliška lékařská, třezalka skvrnitá a lipnice obecná). Proměnné použité ke klasifikaci jsou uvedeny v Grafu 2.

Vzorky pro kontrolu kvality nebyly do analýzy započítávány, jelikož přepočítání na váhu původního vzorku byl aplikován na všechny vzorky.

*V případě třezalky skvrnité nebyly pro LC Q-TOF MS analýzu dostupné výsledky vzorků pod označením K2.

*V případě lipnice obecné nebyly v korelační analýze použity vzorky skupiny K1, jelikož nebyly dostupné informace o obsahu rizikových prvků, byly však zahrnuté ve vícerozměrné analýze.



Graf 2. Proměnné použité ke klasifikaci

Jak je uvedeno výše, všechny vzorky byly analyzovány za použití dvou mobilních fází: kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného. Protože interpretace dat získaných pomocí obou mobilních fází se od sebe nelišila, byly pro diskuzi výsledků použity pouze výsledky za použití kyseliny mravenčí.

5 Výsledky

5.1 Obsah rizikových prvků v půdě a rostlinách

Výsledky analýzy obsahu rizikových prvků ve vzorcích půdy odebraných v zájmové lokalitě jsou zobrazeny v Tabulce 3. V Tabulce 4. jsou zobrazeny výsledky analýzy obsahu rizikových prvků ve všech rostlinných vzorcích odebraných na pokusných polích. Vzorek lipnice K1 chybí, jelikož nebyl pro analýzu dostupný (získaná biomasa byla využita pouze pro stanovení obsahových látek).

Tabulka 2.. Celkový obsah prvků v půdách (výsledky jsou prezentovány jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka)

Lokalita	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
	7,70 $\pm$					
K	1,70	29,3 $\pm$ 6,8	25,0 $\pm$ 5,5	23,1 $\pm$ 8,2	1526 $\pm$ 275	245 $\pm$ 29
C	8,04 $\pm$ 2,12	33,7 $\pm$ 10,9	30,6 $\pm$ 4,1	27,6 $\pm$ 6,7	1872 $\pm$ 346	278 $\pm$ 36
CO	9,75 $\pm$ 0,71	38,9 $\pm$ 8,3	34,8 $\pm$ 1,4	25,6 $\pm$ 2,7	1929 $\pm$ 211	319 $\pm$ 24
SS	7,73 $\pm$ 1,91	40,7 $\pm$ 6,2	33,5 $\pm$ 5,4	30,3 $\pm$ 2,1	1695 $\pm$ 413	290 $\pm$ 67
L	52,8 $\pm$ 12,7	26,6 $\pm$ 3,3	80,9 $\pm$ 6,1	20,7 $\pm$ 1,9	3536 $\pm$ 357	5988 $\pm$ 772

Z Tabulky 2 je vidět, že Cr, Cu a Ni jsou na zájmové lokalitě v normě (Vyhláška č. 153/2016 Sb.), Ni je ve vyšších koncentracích obsažen pouze v půdě z extrémně kontaminované lokality L. Cd, Pb a Zn jsou na zájmové lokalitě hlavními kontaminanty a jejich obsahy jsou extrémně vysoké.

Tabulka 3 prezentuje obsahy prvků v rostlinách dle jednotlivých odběrových míst. Ve srovnání se Směrnicí 2002/32/ES je zřejmé, že v případě olova i kadmia došlo k překročení této normy, u olova to bylo v případě kořenů pampelišky a v jednom vzorku nadzemní biomasy pampelišky, u kadmia to bylo v 89 % všech případů.

Tabulka 3. Obsahy prvků v rostlinách (mg/kg sušiny)

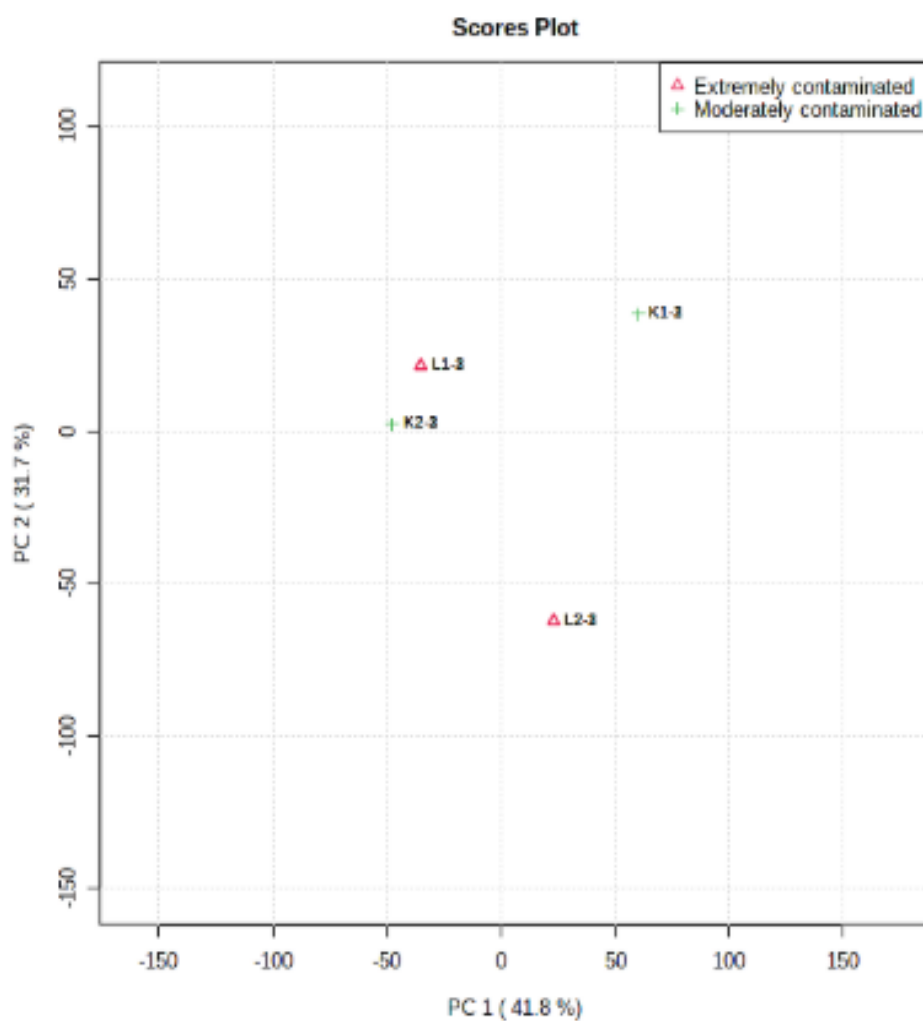
Druh rostliny	Var.	Kontaminace půdy	Stromy	Ošetření	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
<i>A. millefolium</i>	K1	střední	Ne	Ne	4,02	0,42 6	5,83	1,48	8,20	26,4
<i>A. millefolium</i>	K2	střední	Ne	Ne	0,96	0,55 8	5,71	1,52	8,64	24,7
<i>A. millefolium</i>	L1	extrémní	Ne	Ne	4,34	0,41 0	7,82	0,74	1,75	209
<i>A. millefolium</i>	L2	extrémní	Ne	Ne	5,22	0,32 0	8,31	0,76	1,91	313
<i>H. maculatum</i>	K1	střední	Ne	Ne	43,7	0,92 6	11,6	3,10	22,8	91,8
<i>H. maculatum</i>	K2	střední	Ne	Ne	23,9	0,79 8	9,51	3,55	16,6	74,2
<i>H. maculatum</i>	C 1	střední	Ano	Ne	22,6	0,54 2	7,69	1,88	16,3	59,2
<i>H. maculatum</i>	C7	střední	Ano	Ne	6,81	0,33 6	5,95	1,97	6,61	38,1
<i>H. maculatum</i>	Co 3	střední	Ano	Kompost	23,0	0,99 4	7,96	2,93	18,3	73,4
<i>H. maculatum</i>	Co1	střední	Ano	Kompost	29,6	0,85 2	14,6	1,88	19,8	79,4
<i>H. maculatum</i>	Ss 1	střední	Ano	Kal	11,9	0,58 0	6,52	3,55	7,17	38,7
<i>Poa trivialis</i>	C 1	střední	Ano	Ne	1,55	2,69	4,42	2,26	14,8	31,1
<i>Poa trivialis</i>	C2	střední	Ano	Ne	26,7	0,90 5	8,67	2,51	31,9	95,9
<i>Poa trivialis</i>	C7	střední	Ano	Ne	1,20	2,80	7,18	4,23	9,35	62,4
<i>Poa trivialis</i>	Co1	střední	Ano	Kompost	1,10	3,99	8,74	2,72	15,7	53,8
<i>Poa trivialis</i>	Co2	střední	Ano	Kompost	15,1	0,90 7	15,6	3,18	30,2	233
<i>Poa trivialis</i>	Co3	střední	Ano	Kompost	1,29	3,21	8,77	2,44	14,1	36,7
<i>Poa trivialis</i>	Ss 1	střední	Ano	Kal	1,50	1,75	4,29	1,88	9,92	33,6
<i>Poa trivialis</i>	Ss5	střední	Ano	Kal	0,78	3,64	6,48	3,07	7,84	44,6
<i>Poa trivialis</i>	Ss7	střední	Ano	Kal	0,88	1,59	9,22	2,02	10,2	44,2
<i>T. sect. Ruderalia kořen</i>	K 1/K	střední	Ne	Ne	6,30	4,37	15,5	9,61	54,9	57,8
<i>T. sect. Ruderalia kořen</i>	C 1/K	střední	Ano	Ne	8,34	3,75	20,6	9,57	215	63,7
<i>T. sect. Ruderalia kořen</i>	Co 3/K	střední	Ano	Kompost	7,51	3,41	18,7	13,5	96,2	64,1
<i>T. sect. Ruderalia kořen</i>	Ss 1/K	střední	Ano	Kal	11,6	3,56	16,6	9,21	95,2	80,1
<i>T. sect. Ruderalia listy</i>	K 1	střední	Ne	Ne	6,10	2,91	13,5	6,36	30,0	72,0
<i>T. sect. Ruderalia listy</i>	C 1	střední	Ano	Ne	7,42	1,62	9,68	2,46	27,1	59,7

T. sect. Ruderalia listy	Co	střední	Ano	Kompost	11,4	1,90	12,6	3,51	47,0	102
T. sect. Ruderalia listy	Ss 1	střední	Ano	Kal	17,9	2,14	11,1	3,89	25,0	109

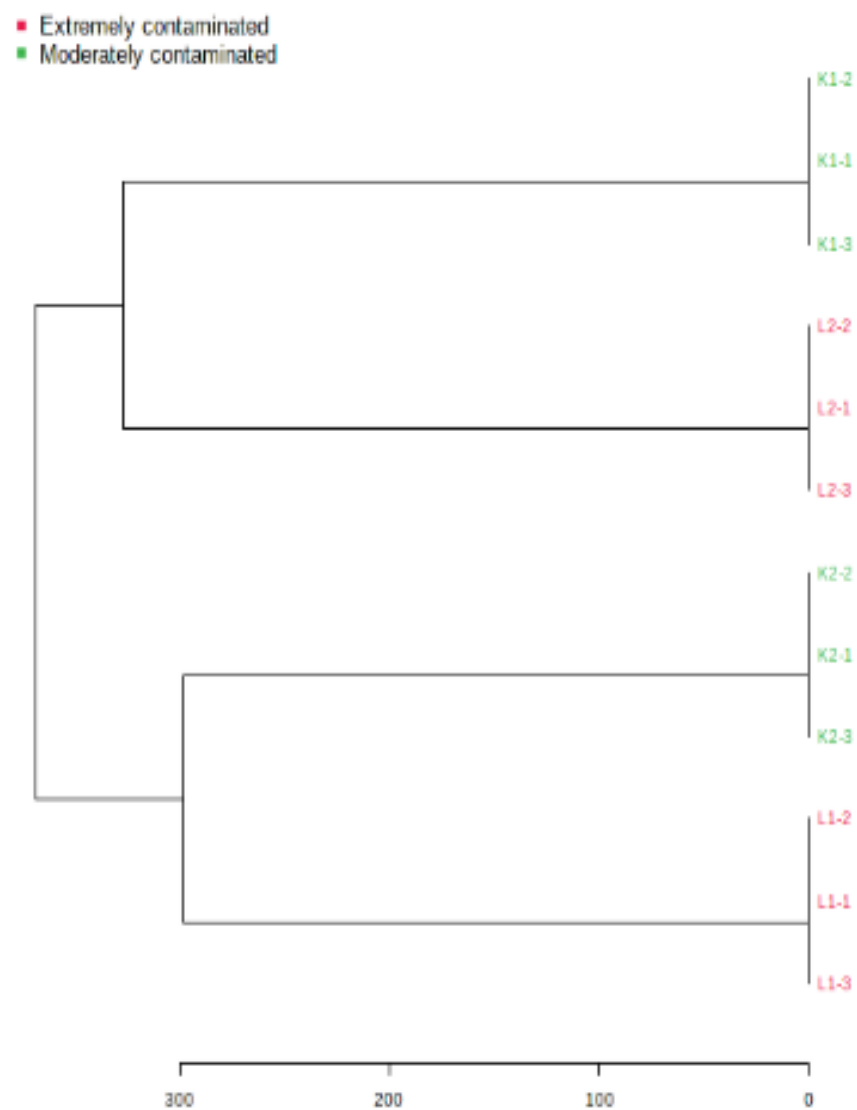
5.2 Výsledky vícerozměrné analýzy

5.2.1 řebříček obecný (*Achillea millefolium*)

Vzorky řebříčku byly seskupeny podle úrovně kontaminace půdy, vzhledem k tomu, že byly všechny vzorky odebrány mimo vytyčená pole. Výsledný graf analýzy hlavních komponent (PCA) je uveden na Grafu 3, hierarchická shluková analýza je zobrazena na Grafu 4. Výsledky ale naznačují, že zastoupení obsahových látek nebylo ovlivněno úrovní kontaminace půdy v místě odběru.



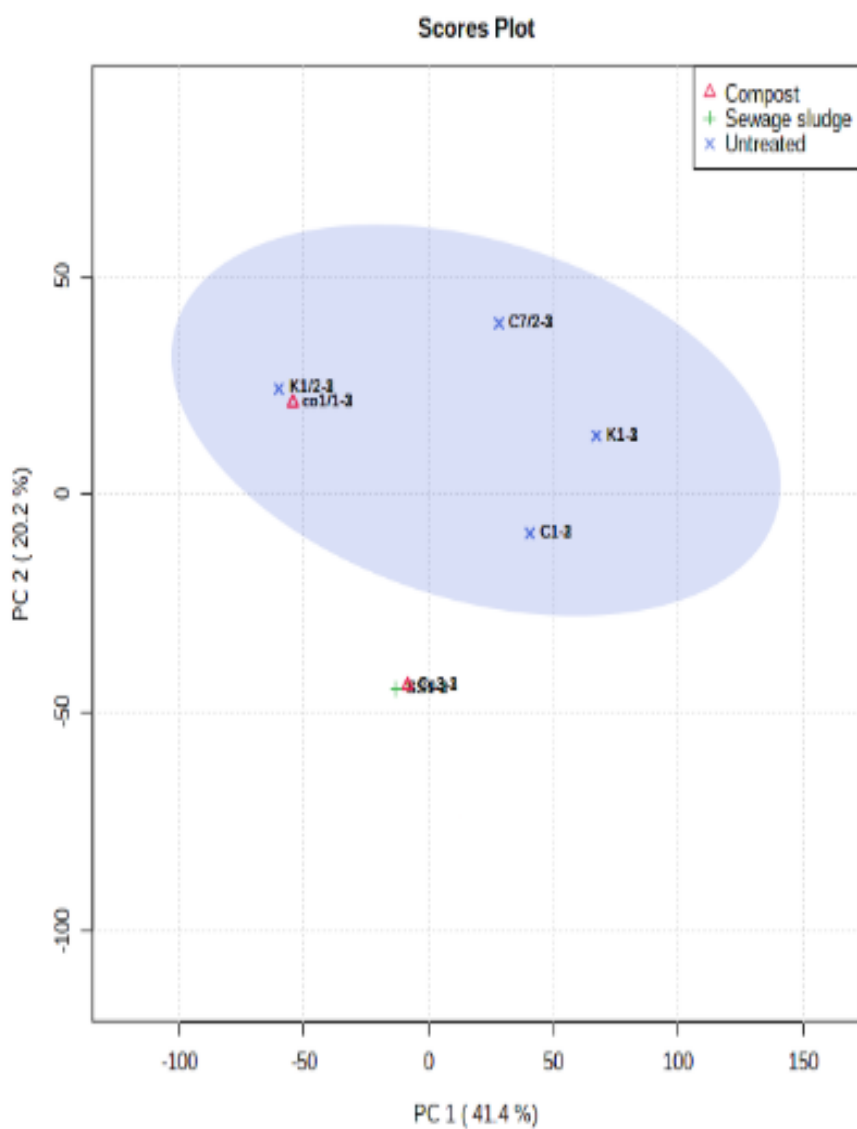
Graf 3. Rozložení skupin vzorků v PCA analýze - řebříček obecný



Graf 4. hierarchická shluková analýza - řebříček obecný

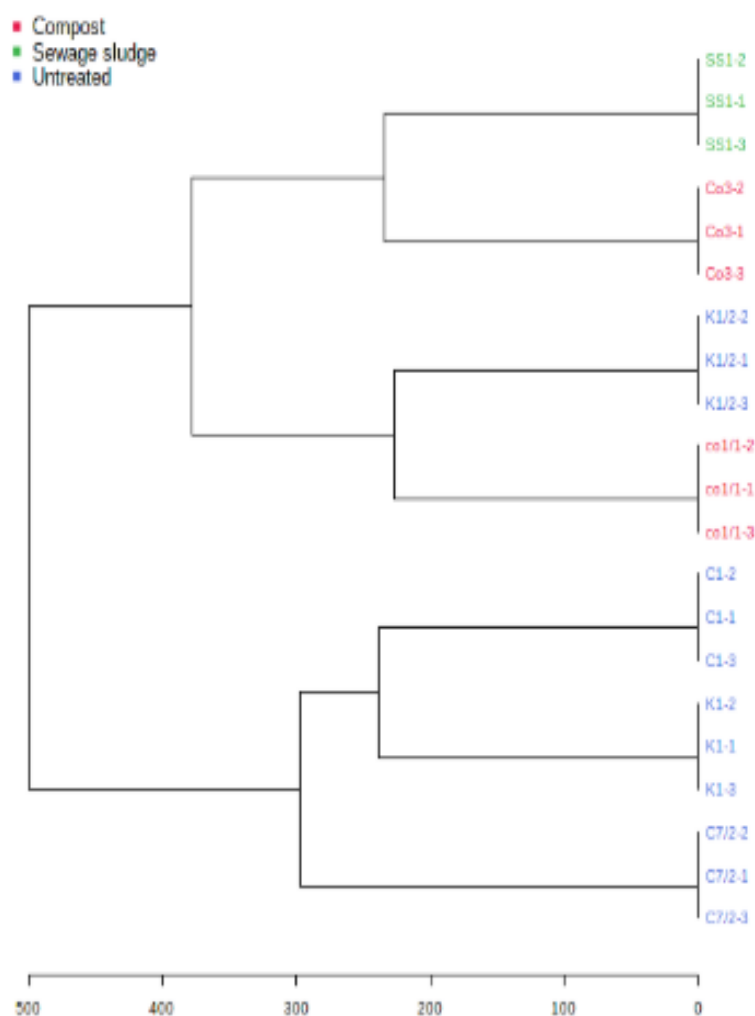
5.2.2 třezalka skvrnitá (*Hypericum maculatum*)

Výsledek PCA analýzy je zobrazen v Grafu 5. Tyto skupiny vzorků byly všechny sbírány na mírně kontaminované půdě pokusných polí, proto byla klasifikace těchto vzorků uskutečněna na základě užitého ošetření půdy.



Graf 5. Výsledky PCA - třezalka skvrnitá

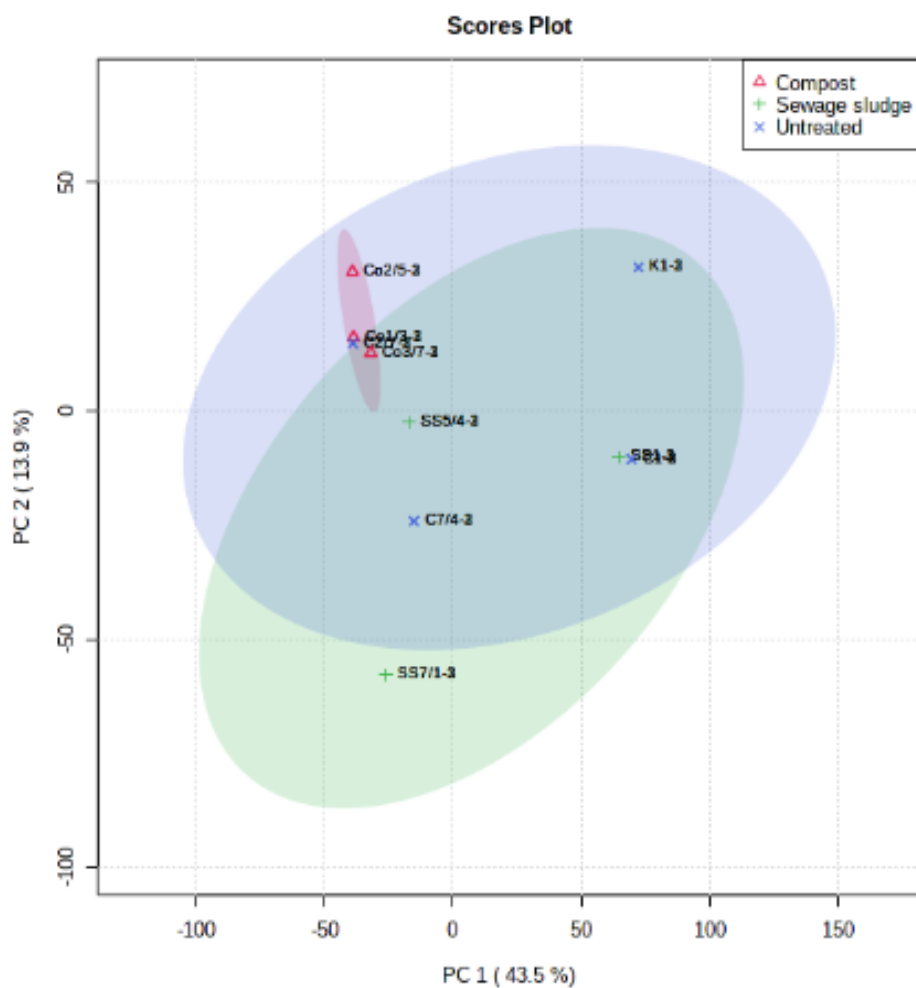
Jak je vidět na výsledcích PCA, vzorky z půd ošetřených čistírenským kalem SS1 a kompostem Co3 vykazovaly podobné charakteristiky, a neošetřené K1/2 a kompost Co1 byly také seskupené dohromady. Pro detailnější klasifikaci je přiloženo vyobrazení hierarchické shlukové analýzy na Grafu 6, která toto pozorování potvrzuje. Zdá se tedy, že obsahy rizikových prvků i obsahových látek v třezalce skvrnitá mohou být ovlivněny aplikací čistírenského kalu.



Graf 6. Hierarchická shluková analýza - třezalka skvrnitá

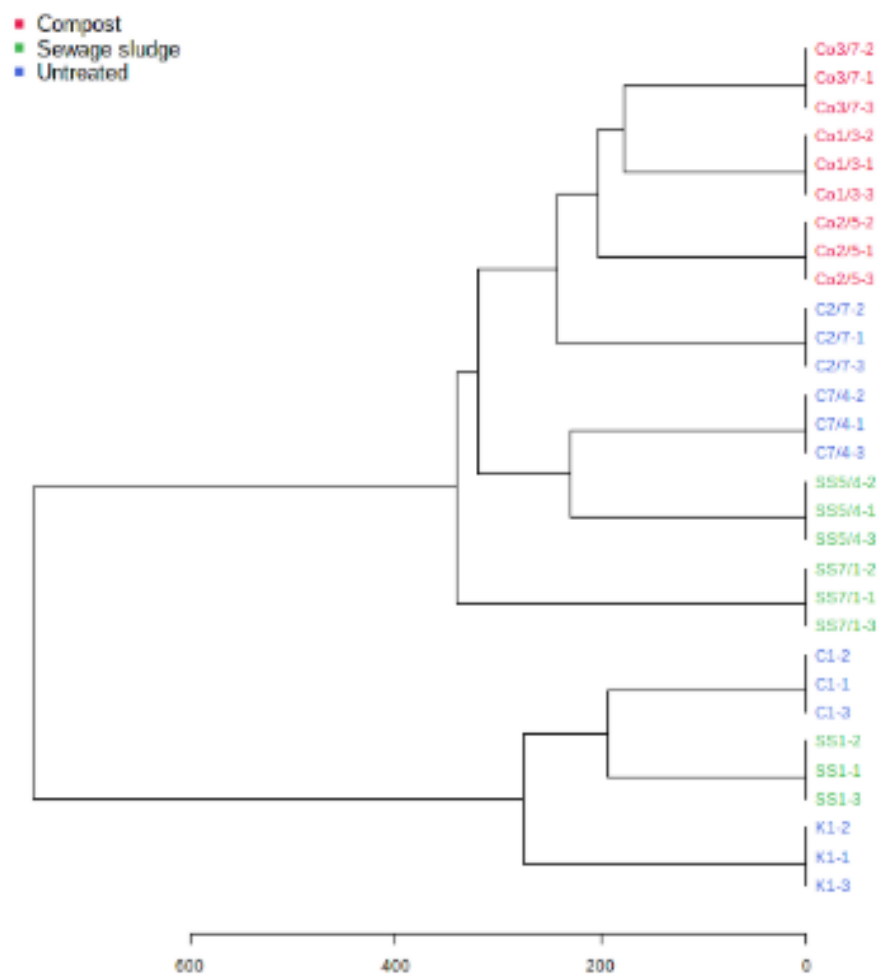
5.2.3 lipnice obecná (*Poa trivialis*)

Vzorky lipnice obecné byly taktéž seskupeny dle ošetření půd, stejně jako vzorky třezalky skvrnité. Výsledek PCA je vidět na Grafu 7.



Graf 7. výsledky PCA - lipnice obecná

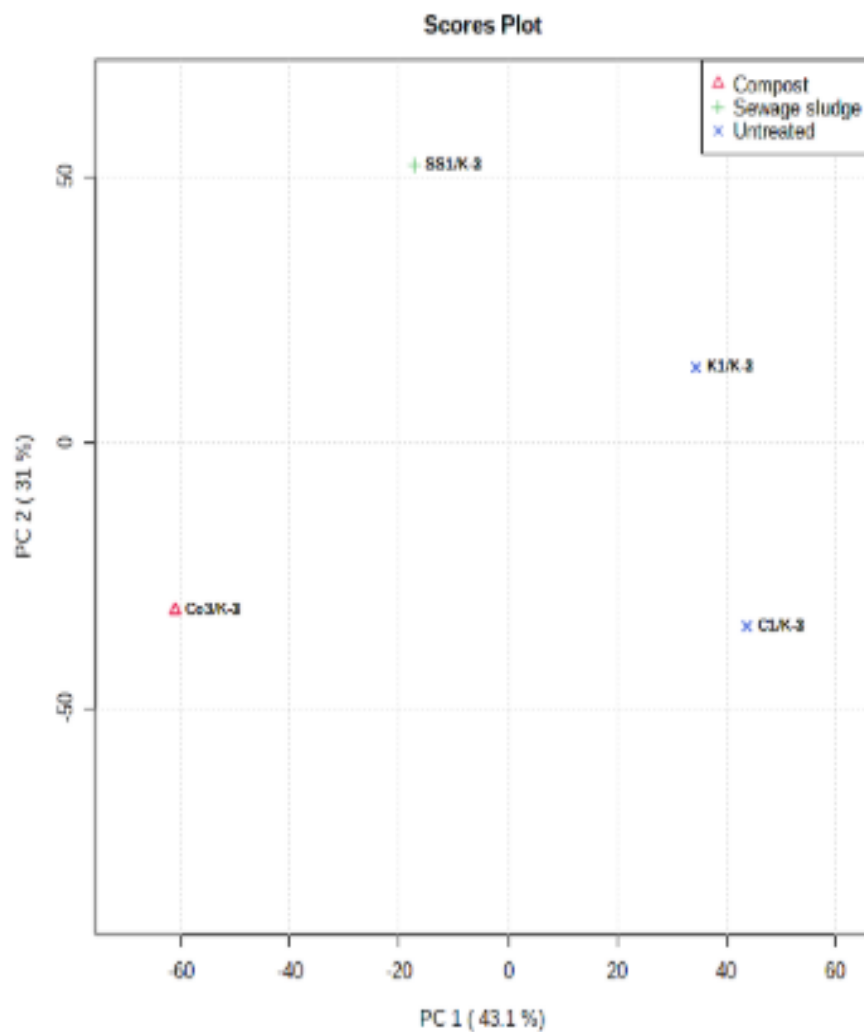
Vzorky ze všech polí ošetřených kompostem vykazovaly podobné charakteristiky, zároveň s nimi i vzorek z neošetřeného pole C2. Naopak vzorek z pole ošetřeného čistírenským kalem SS7 se osamostatnil od všech ostatních. Detailnější seskupení vzorků je vidět na Grafu 8. Výsledek je v tomto případě zkreslený velkou heterogenitou výsledků, zejména v případě kadmia.



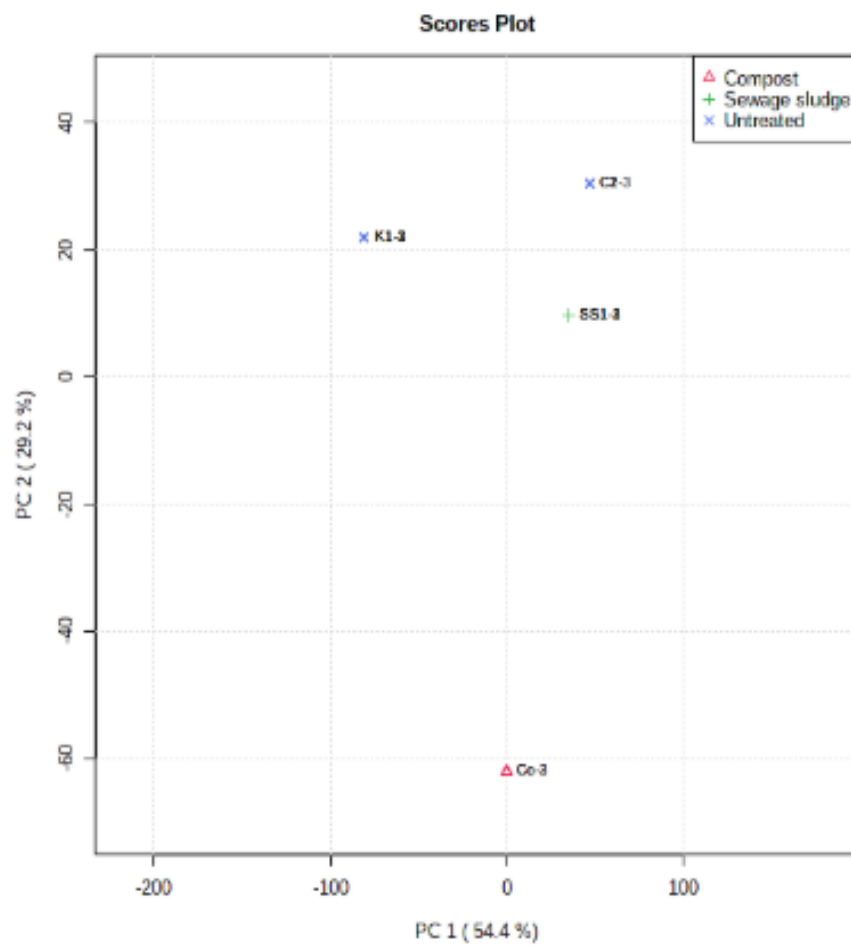
Graf 8. hierarchická shluková analýza - lipnice obecná

5.2.4 pampeliška lékařská (*Taraxacum sect. Ruderalia*)

Vzorky pampelišky byly taktéž seskupeny podle ošetření půd pokusných polí na kterých odebrané vzorky rostly. Vzorky pampelišky byly navíc rozdělené na kořen a listy. Výsledky PCA kořenů jsou zobrazeny na Grafu 9, výsledky PCA listů jsou vidět na Grafu 10.

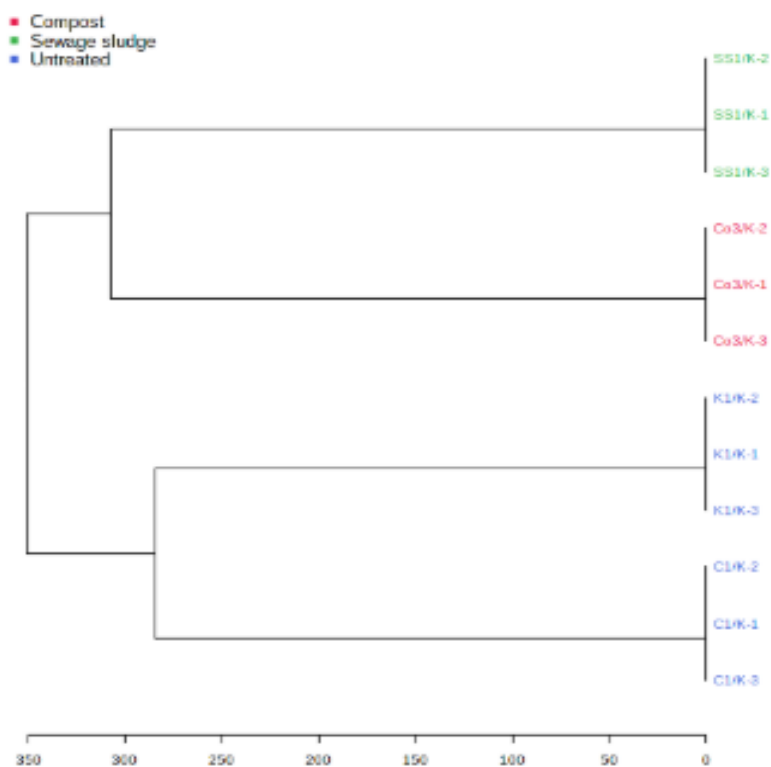


Graf 9. PCA výsledky - kořen pampelišky

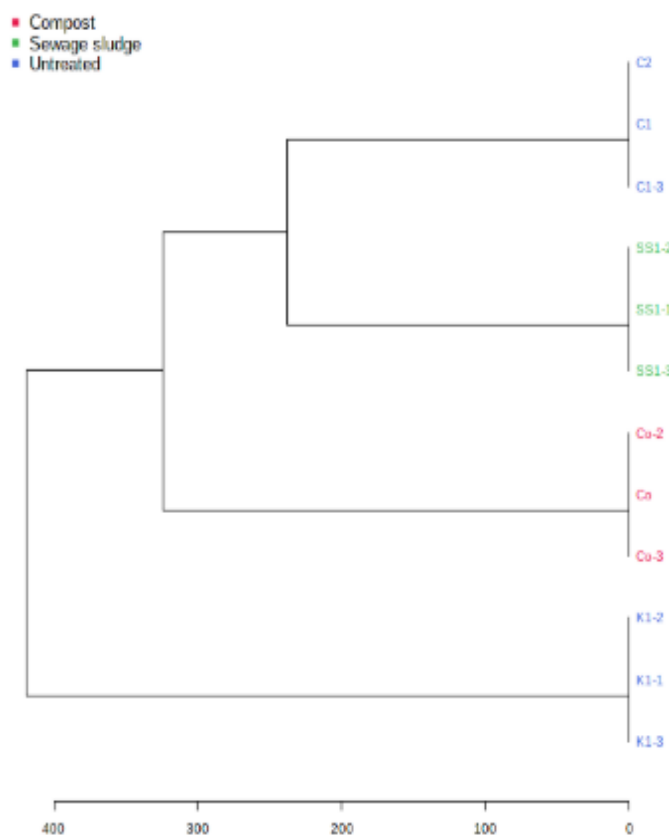


Graf 10. PCA výsledky - listy pampelišky

Na grafech 9 a 10 je vidět, že vzorky kořene a listů nevykazovaly podobné charakteristiky. Podrobnější schéma lze vidět v Grafech 11 a 12.



Graf 11. Hierarchická shluková analýza - kořen pampelišky lékařské



Graf 12. Hierarchická shluková analýza - listy pampelišky lékařské

5.3 Výsledky korelací

Všechna získaná chromatografická data byla korelována s jejich obsahem rizikových prvků v příslušných rostlinách. Protože předchozí vícerozměrná analýza neprokázala odlišnost metabolomu sledovaných rostlin v závislosti na ošetření pokusných pozemků, byly pro korelační analýzu použity všechny vzorky příslušné rostliny jako jeden soubor. Ve všech vzorcích byly výsledky korelace filtrovány podle vysoké korelační hodnoty, mezní bod byl korelační koeficient hodnoty $r = 0,9/-0,9$. Látky, které silně korelovaly s příslušnými rizikovými prvky jsou vyneseny v příslušných grafech umístěných níže.

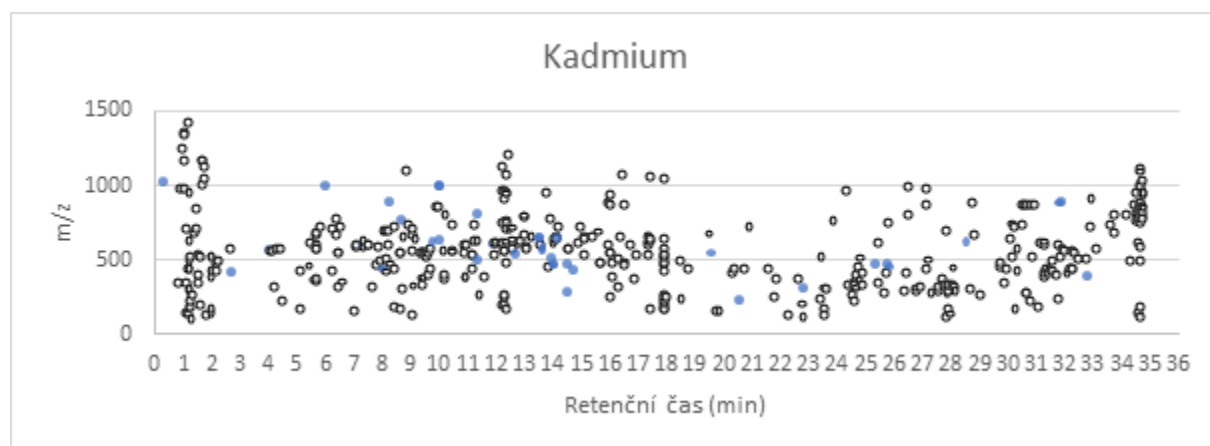
Obsahové látky v rostlinách lze identifikovat podle retenčního času. Mezi látky s krátkým retenčním časem patří aminokyseliny a peptidy, tuky a sacharidy, látky se středně dlouhým retenčním časem jsou především fenolické látky a mezi látky s nejdelším retenčním časem se řadí především estery, steroly a lipofilní sloučeniny.

Prázdná a černá kolečka v grafech znázorňují negativní korelaci (tzn. obsah rizikového prvku v těchto případech rostlinný metabolom ovlivnil negativně), barevná naopak korelaci pozitivní (tzn. rizikový prvek rostlinný metabolom ovlivnil pozitivně).

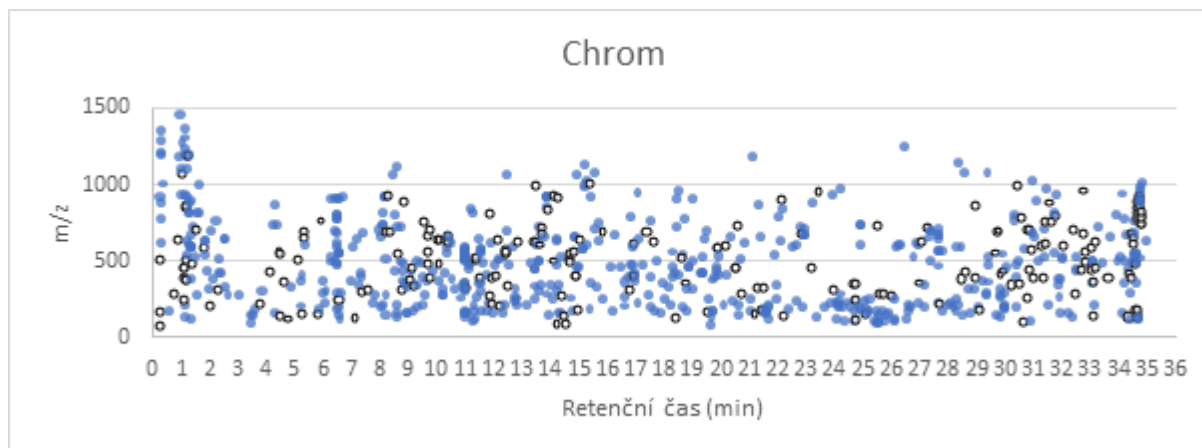
řebříček obecný (*Achillea millefolium*)

Korelace aktivních látek s jednotlivými rizikovými prvky v řebříčku obecném jsou znázorněny na Grafech 13 až 18. Z grafů je patrné, že obsahové látky v řebříčku negativně korelovaly

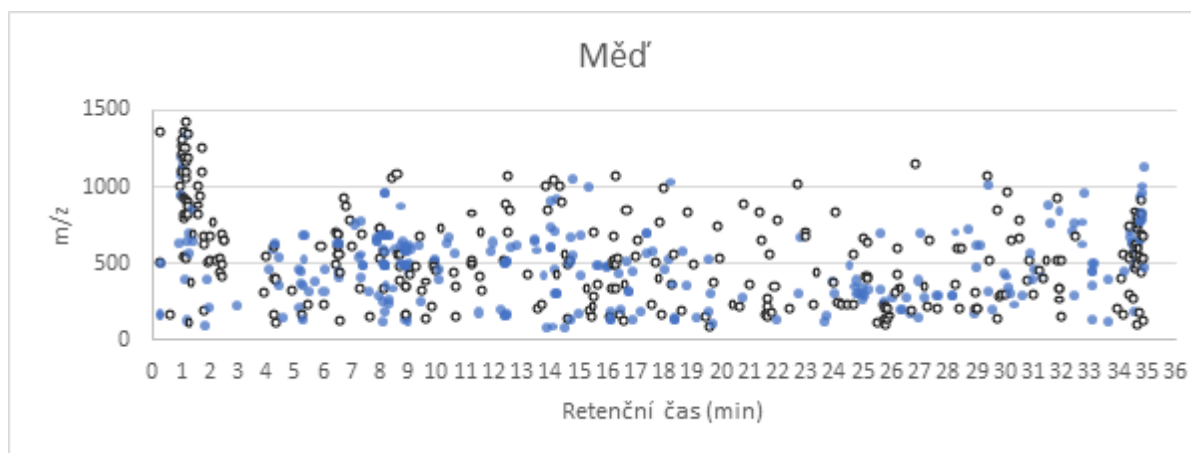
s kadmíem, u ostatních prvků se zdá, že zvyšující se obsah prvku ovlivňuje obsahové látky pozitivně, z nich nejlépe reagoval na přítomnost chromu.



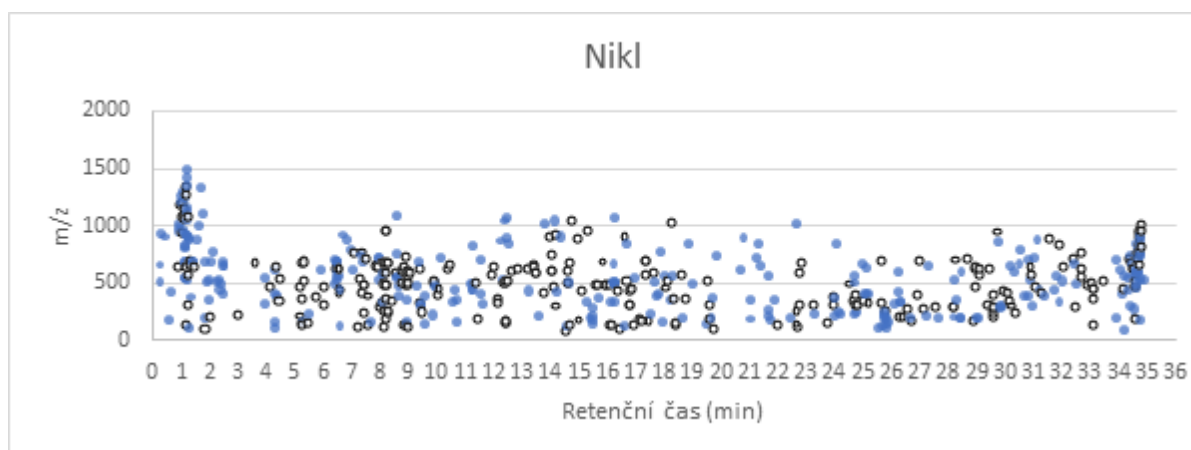
Graf 13. korelace řebříček obecný - kadmium



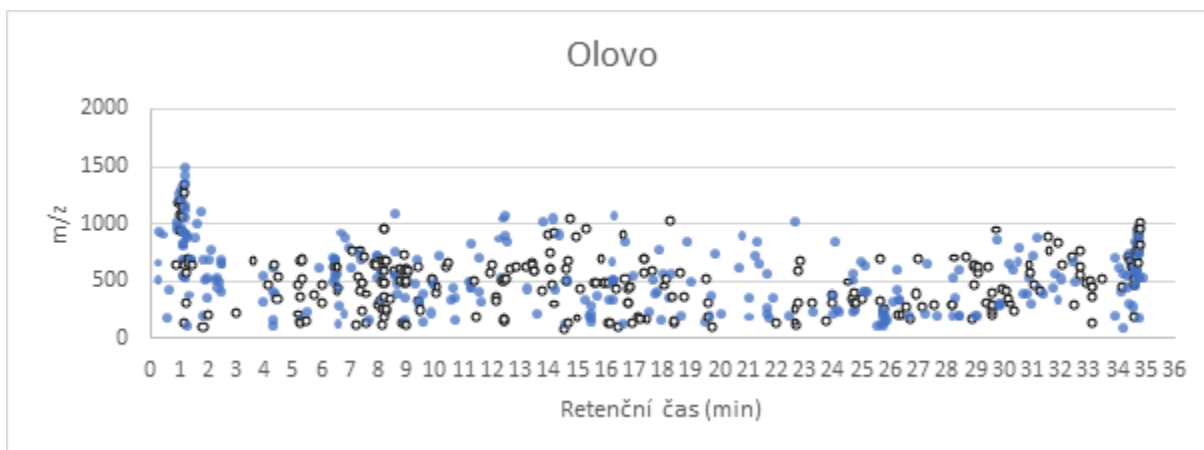
Graf 14. korelace řebříček obecný - chrom



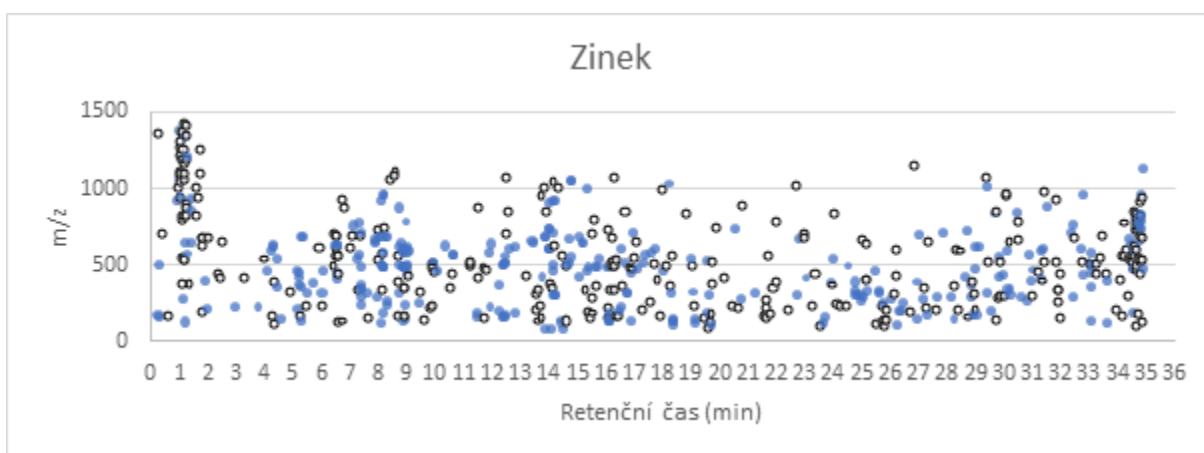
Graf 15. korelace řebříček obecný - měď



Graf 16. korelace řebříček obecný - nikl



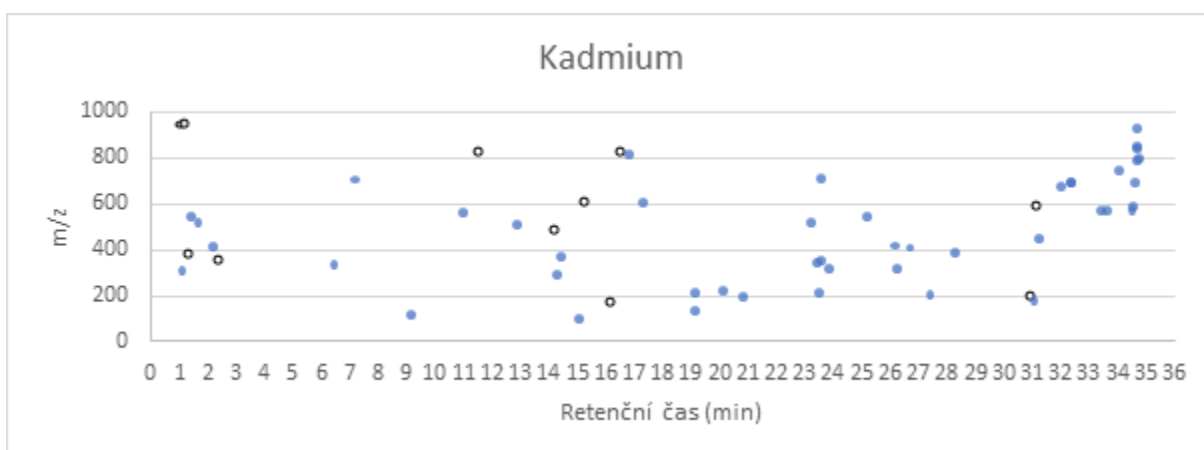
Graf 17. korelace řebříček obecný - olovo



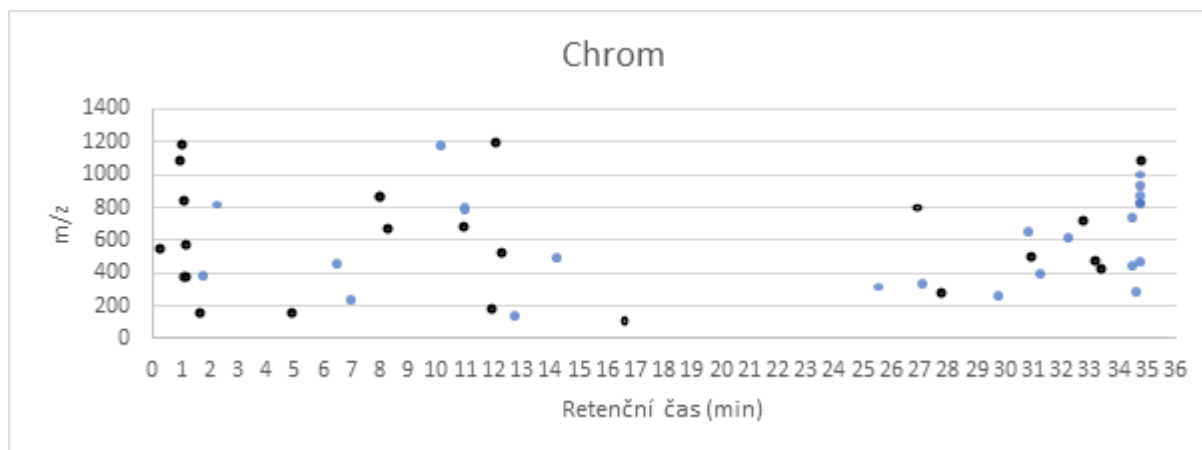
Graf 18. korelace řebříček obecný - zinek

třezalka skvrnitá (*Hypericum maculatum*)

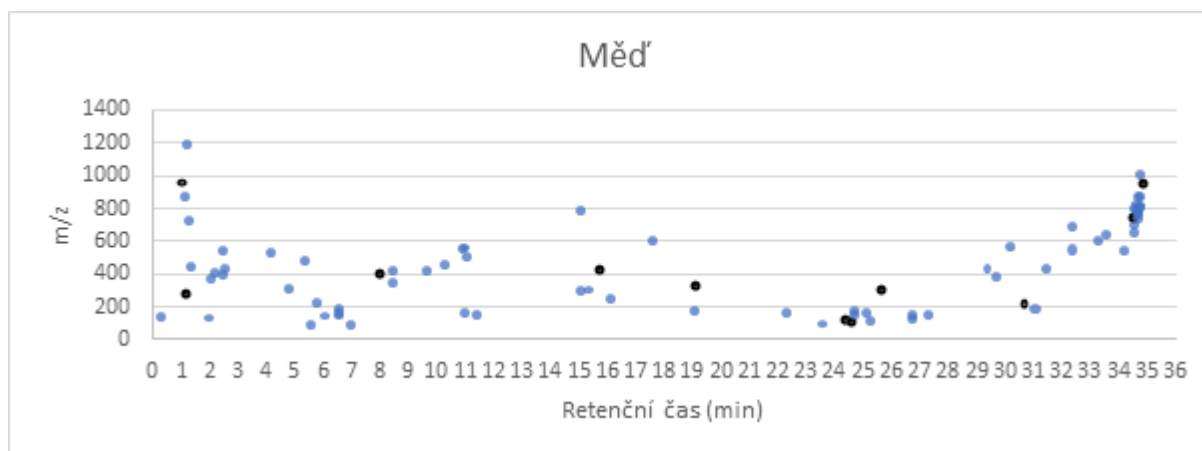
Jak je znázorněno v Grafech 19 až 24, nebyly obsahové látky třezalky přítomností prvků příliš ovlivněny, prokázaných závislostí bylo zaznamenáno ve srovnání s řebříčkem obecným významně méně. Grafy dokumentují, že většina prokázaných korelací naznačuje stimulaci obsahových látek při zvýšeném obsahu prvků, a to i v případě kadmia.



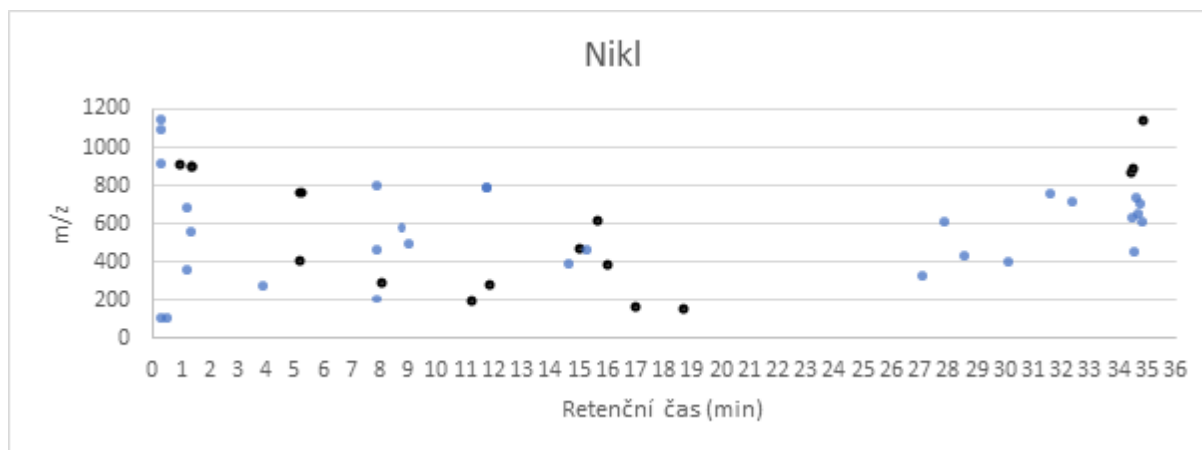
Graf 19. korelace třezalka skvrnitá - kadmium



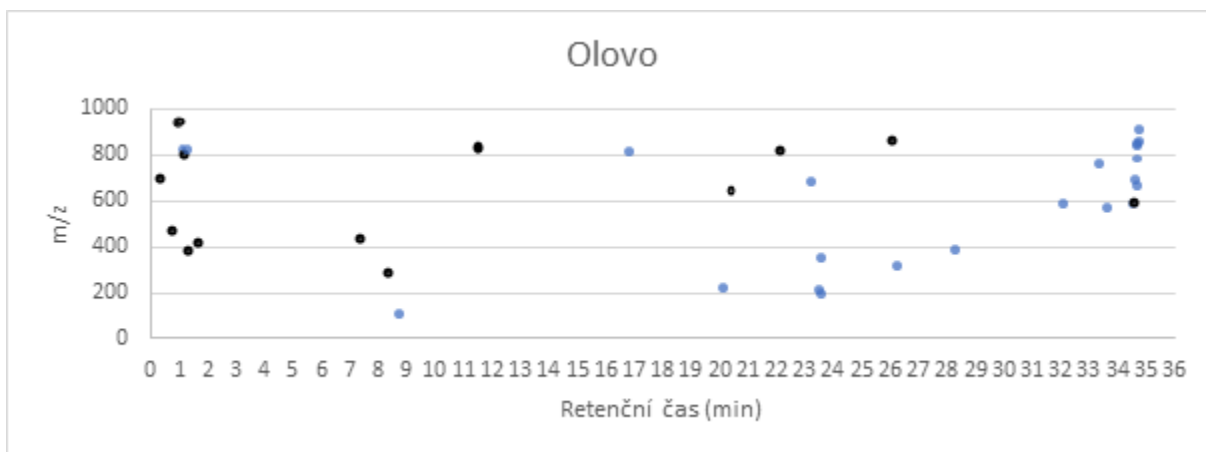
Graf 20. korelace třezalka skvrnitá - chrom



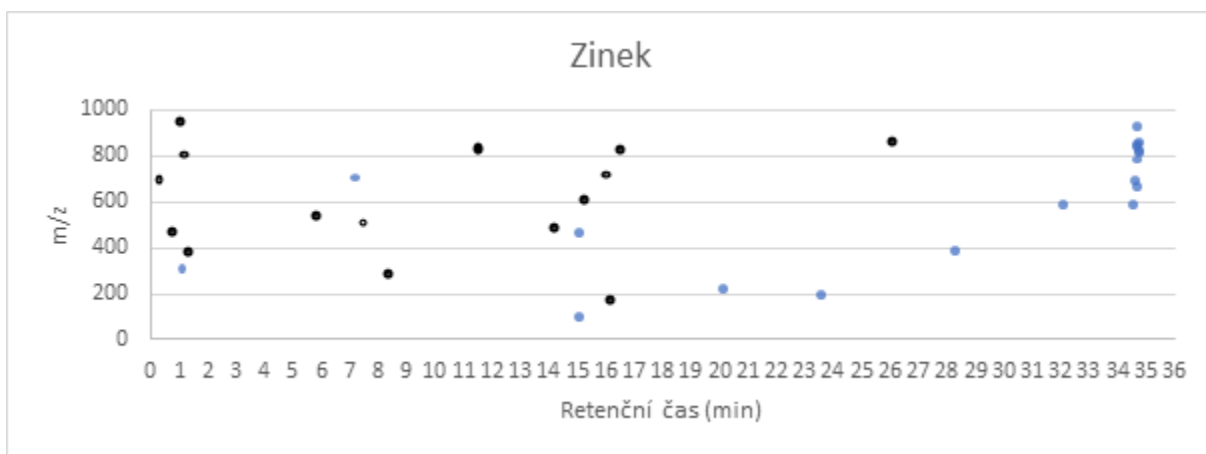
Graf 21. korelace třezalka skvrnitá - měď



Graf 22. korelace třezalka skvrnitá - nikl



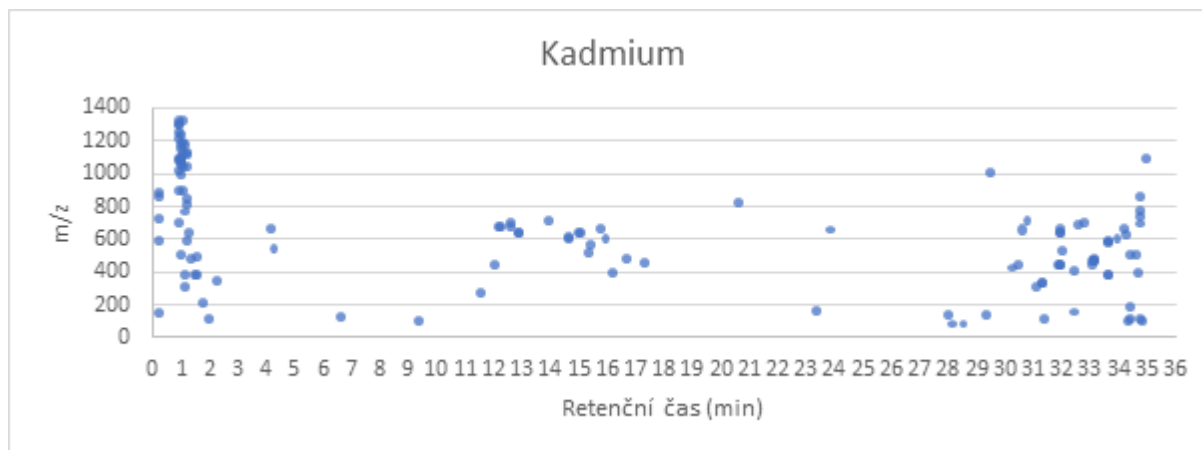
Graf 23. korelace třezalka skvrnitá - olovo



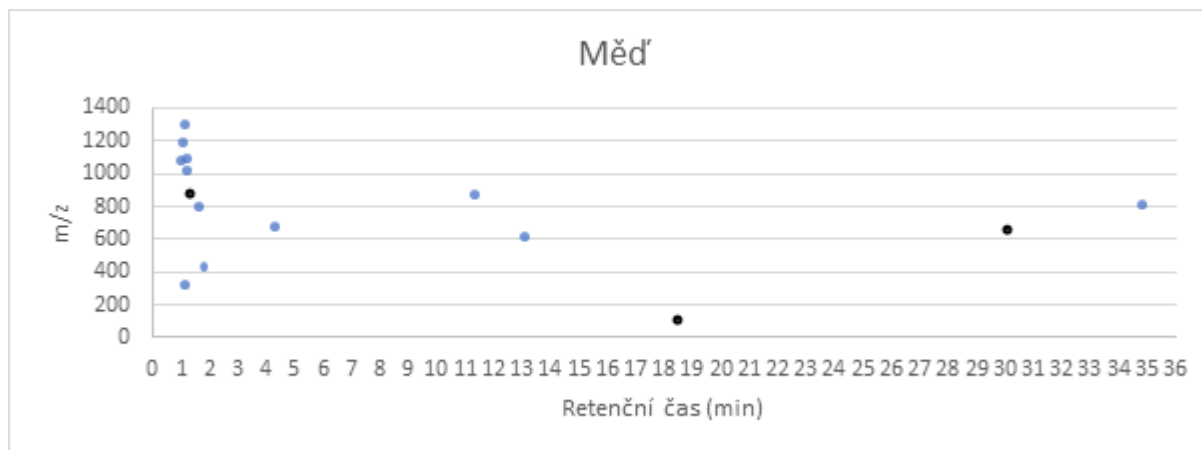
Graf 24. korelace třezalka skvrnitá - zinek

lipnice obecná (*Poa trivialis*)

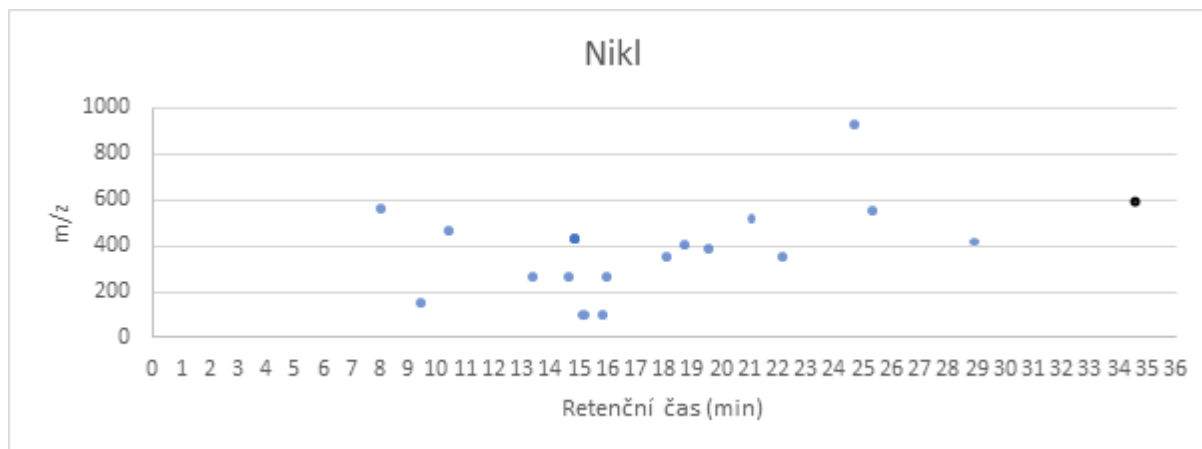
Výsledky korelací lipnice obecné jsou vidět v Grafech 25 až 29. Látky obsažené v lipnici nebyly nijak ovlivněny přítomností chromu, proto zde případný graf korelace s chromem chybí. Podobně jako v případě třezalky všechny ostatní prvky (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) stimulovaly hladinu obsahových látek.



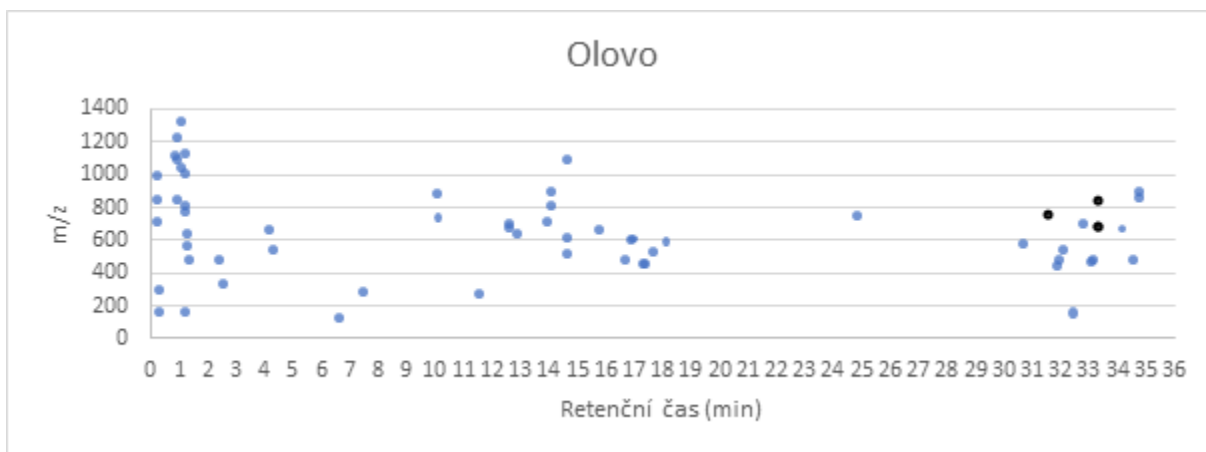
Graf 25. korelace lipnice obecná - kadmium



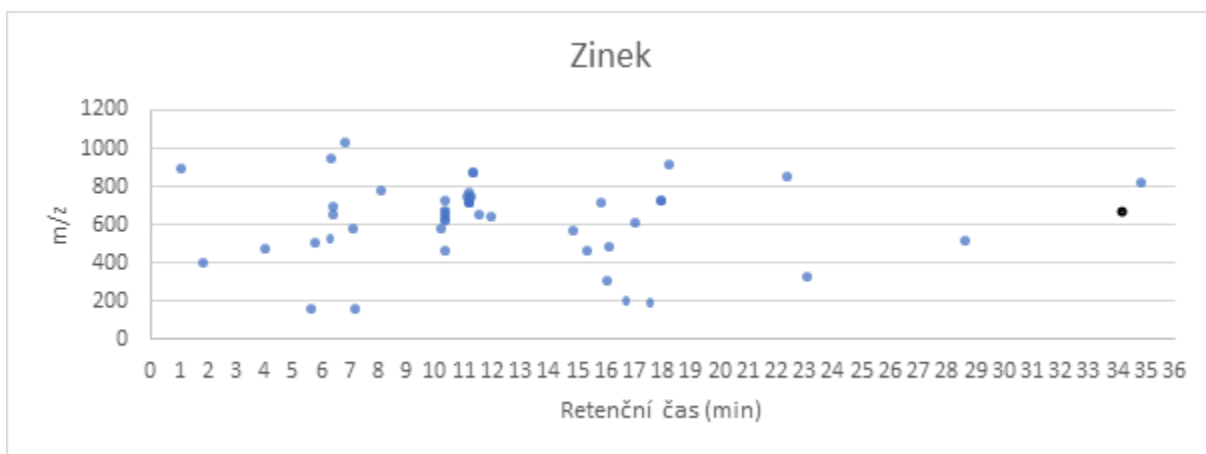
Graf 26. korelace lipnice obecná - měď



Graf 27. korelace lipnice obecná - nikl



Graf 28. korelace lipnice obecná - olovo

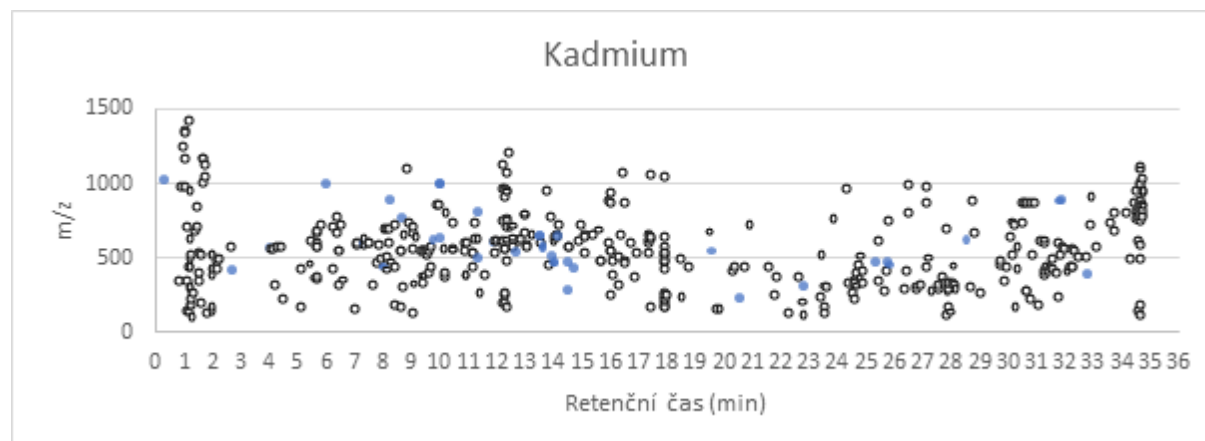


Graf 29. korelace lipnice obecná – zinek

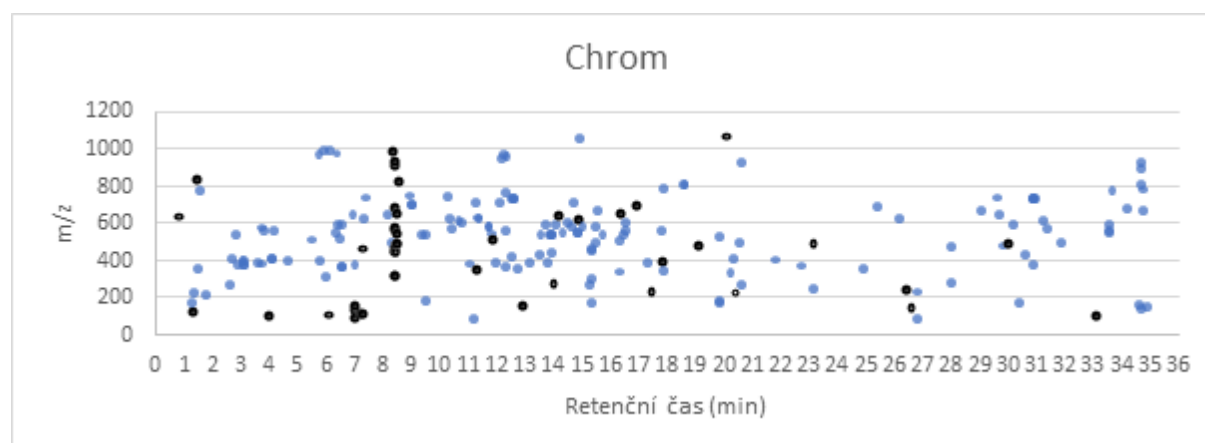
pampeliška lékařská (*Taraxacum sect. Ruderalia*)

kořen:

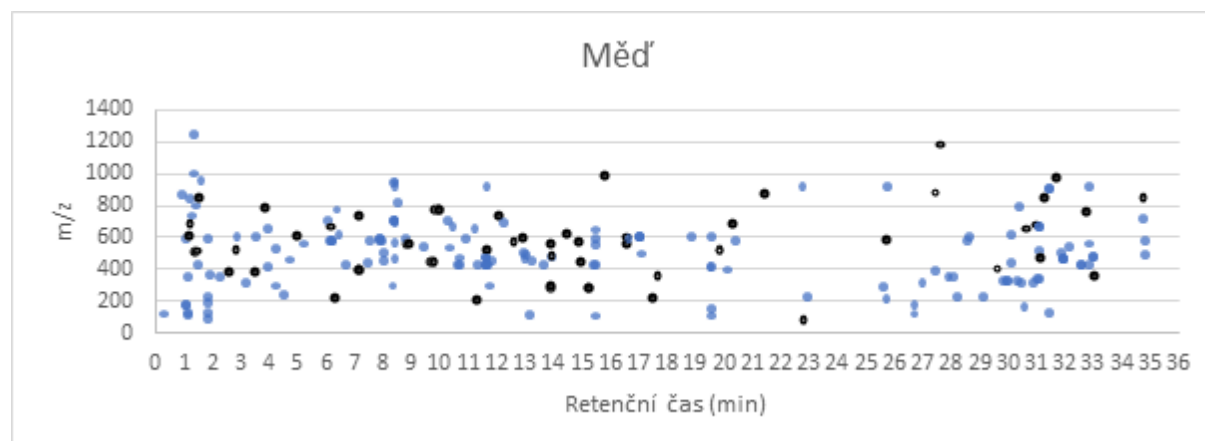
Výsledky korelací kořene pampelišky jsou vidět na Grafech 30 až 36. Je zde patrný negativní vliv kadmia, olova a zinku. Vliv niklu byl naopak velmi pozitivní, vliv chromu a mědi byl také spíše pozitivní.



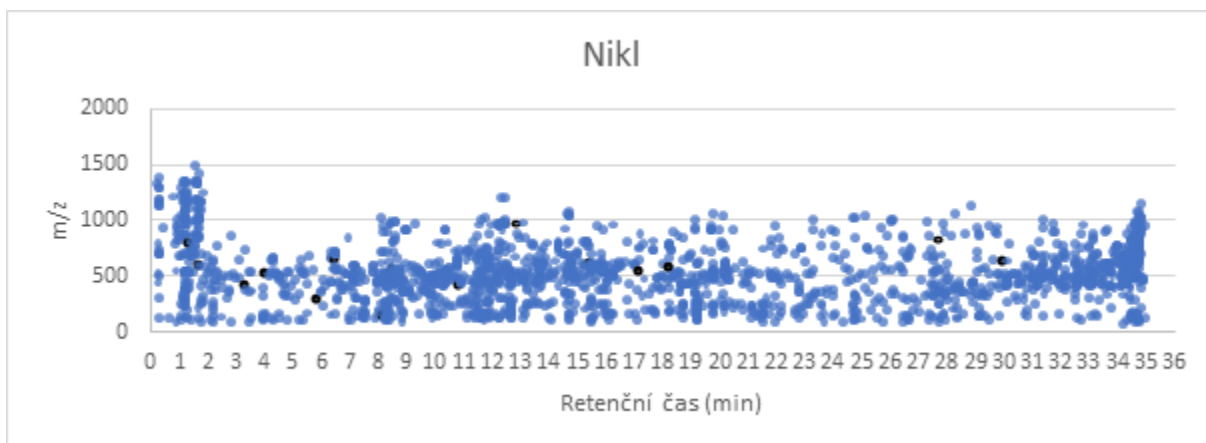
Graf 30. korelace pampeliška lékařská, kořen - kadmium



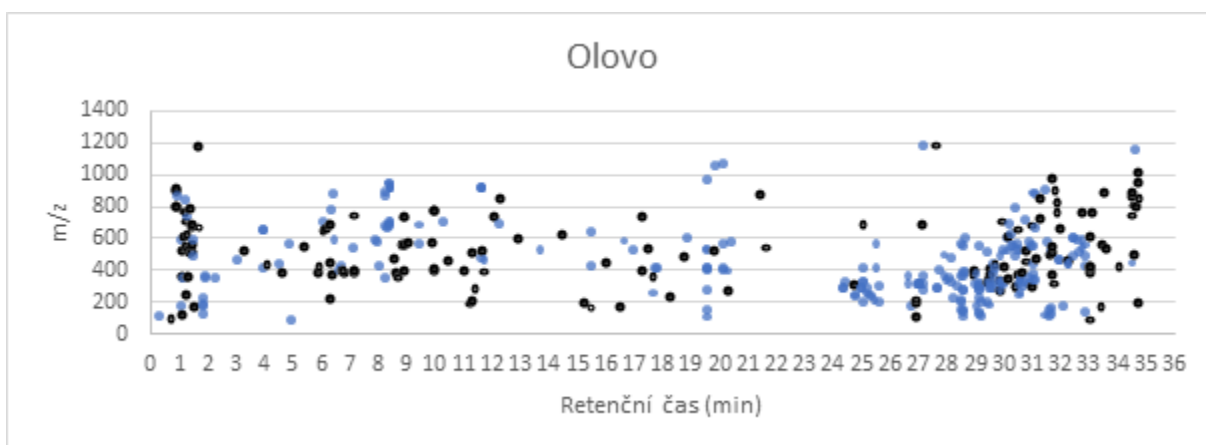
Graf 31. korelace pampeliška lékařská, kořen - chrom



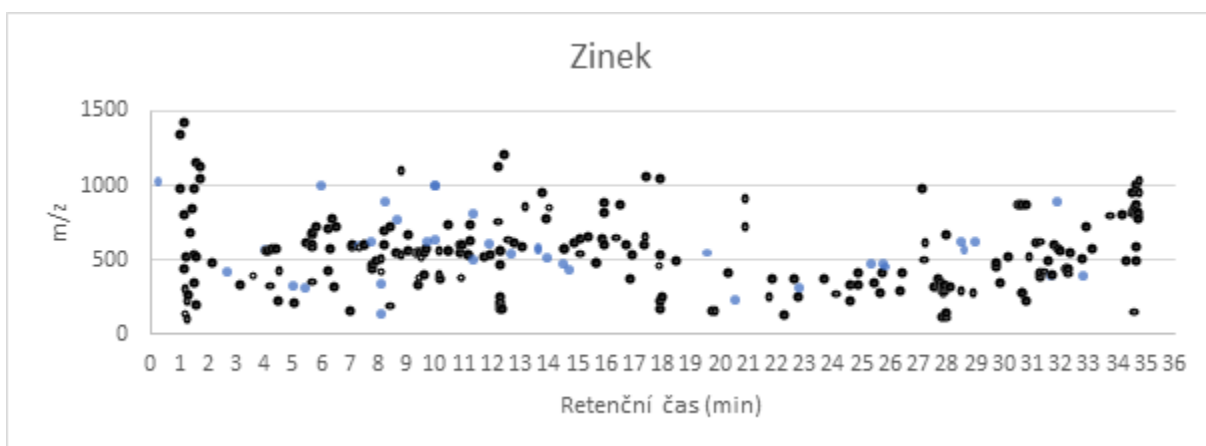
Graf 32. korelace pampeliška lékařská, kořen - měď



Graf 33. korelace pampeliška lékařská, kořen - nikl



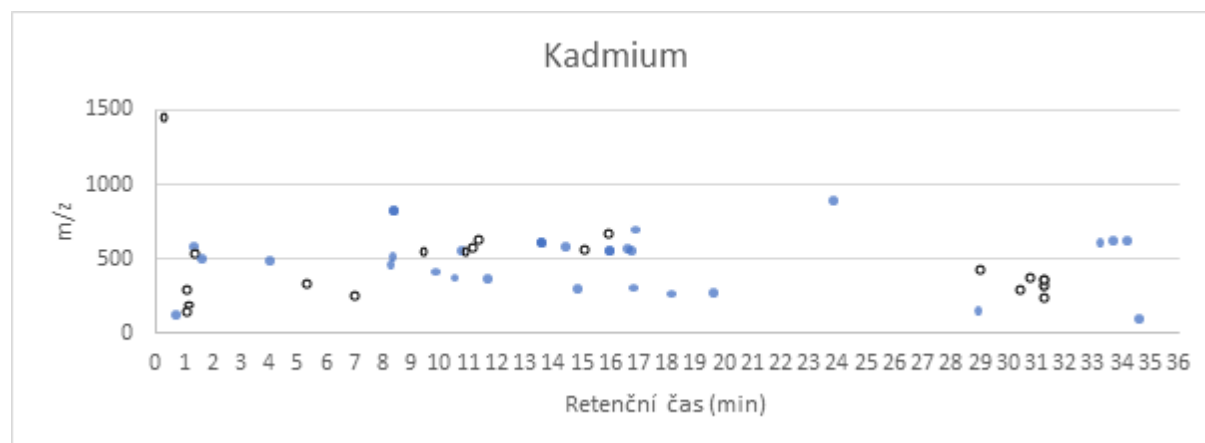
Graf 34. korelace pampeliška lékařská, kořen - olovo



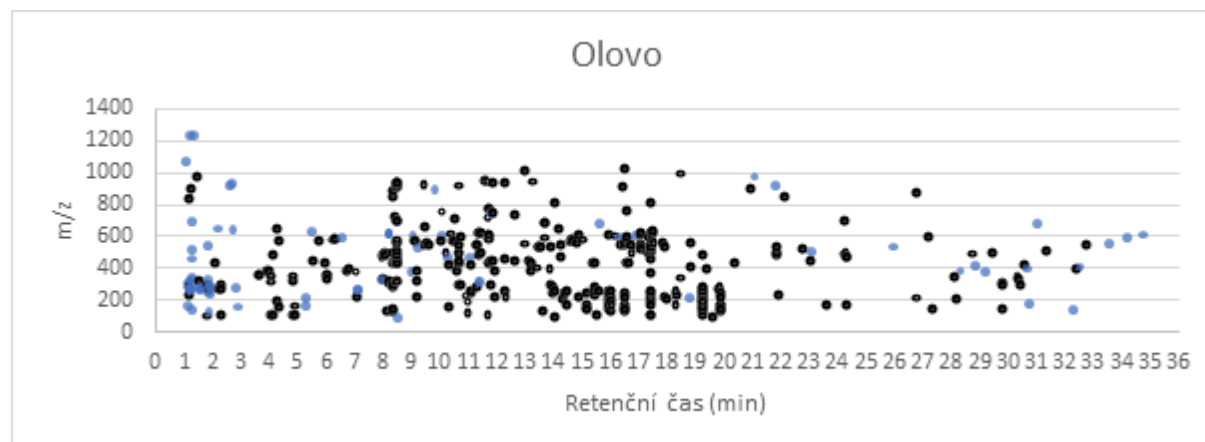
Graf 35. korelace pampeliška lékařská, kořen – zinek

listy:

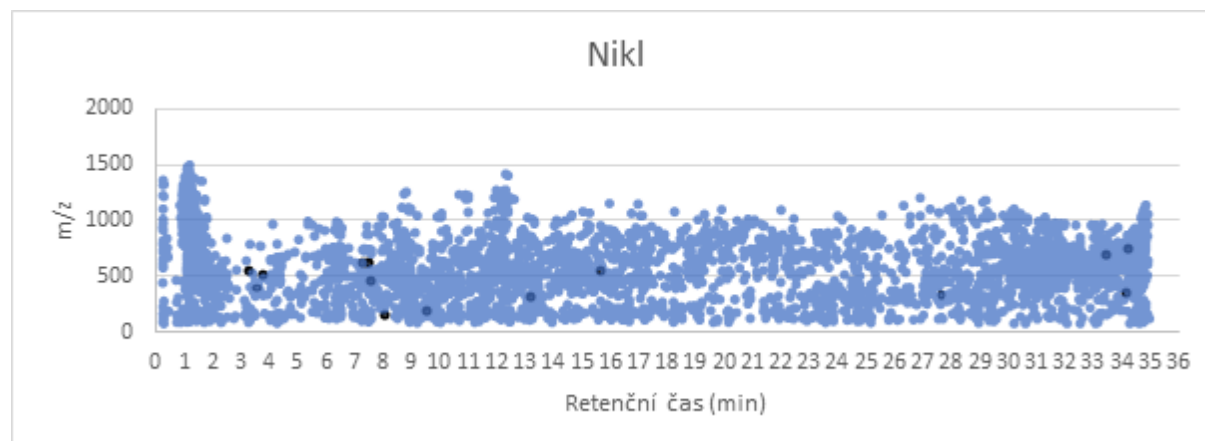
Na grafech 36 až 39 jsou znázorněny výsledky korelací listů pampelišky. Na obsahové látky listů pampelišky neměla vliv přítomnost mědi a chromu, grafy těchto prvků proto chybí. Z výsledných grafů je patrné, že olovo mělo na látky nadzemní biomasy pampelišky jednoznačně negativní vliv, kadmium a zinek vykazují nejednoznačné výsledky. Nikl měl však jednoznačně účinky pozitivní.



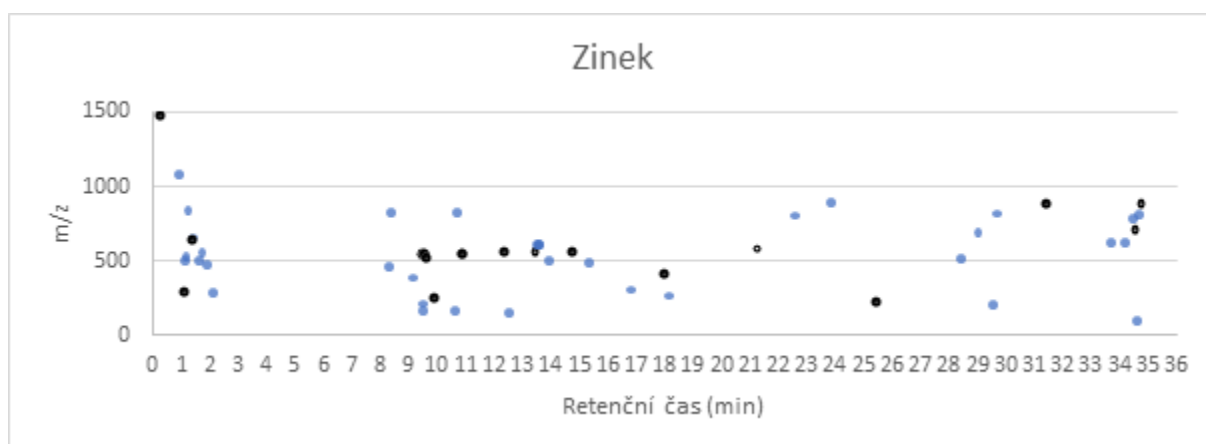
Graf 36. korelace pampeliška lékařská, listy - kadmium



Graf 37. korelace pampeliška lékařská, listy - olovo



Graf 38. korelace pampeliška lékařská, listy - nikl



Graf 39. korelace pampeliška lékařská, listy - zinek

Při porovnání korelací kořene a listů je patrné, že většina dopadů rizikových prvků je v oblasti kořene. Listy pampelišky trpí především na přítomnost olova. Celkově pozitivní vliv měla přítomnost niklu.

6 Diskuze

Experimentální remediační pole v zájmové lokalitě pokrývají plochu o rozloze zhruba 0,5 ha, pokus běží již přes 10 let, od roku 2008, přičemž ošetření půdy kompostem a čistírenskými kaly proběhlo pouze na začátku pokusu, během pokusu již půda znovu ošetřována nebyla. Stromy použité pro fytoextrakci byly vysazeny pouze jednou na začátku pokusu s kontrolní sklizní po čtyřech letech v roce 2012 a další kontrolní sklizní v roce 2014. Stromy byly sázeny na ošetřená i neošetřená pole, přičemž Kubátová et al. (2016) uvádějí, že ošetření čistírenskými kaly dokonce limitovalo růst stromů v prvních několika letech, zejména kvůli konkurenci ostatních rostlin

a vyšším koncentracím prvků dostupných v půdě a tím nižším výnosům oproti kontrolním vzorkům. V další kontrole o dva roky později pak měly větší výnosy právě stromky na polích ošetřených SS, díky lépe vyvinutým kořenům. Naše výsledky (Tabulka 2) ale ukazují, že celkové obsahy prvků jsou na ošetřených i neošetřených polích srovnatelné a neliší se ani od varianty K, tedy půdy odebrané v místech, kde stromy vysázené nejsou. Remediační opatření tedy zatím podstatný vliv na obsahy prvků v půdách nemělo.

To se odrazilo také na obsazích sledovaných prvků v rostlinách (Tabulka 3). Jsou zřejmé velké rozdíly mezi druhy a také mezi sledovanými prvky, a to bez ohledu na ošetření daného pole. Vzorky rostlin na pokusných polích byly odebírány na jednotlivých polích náhodně, což vedlo k velké variabilitě získaných výsledků. Důkazem této skutečnosti je i fakt, že v případě řebříčku obecného lze v Tabulce 3 vidět velký rozdíl v obsazích kadmia ve dvou vzorcích odebraných ze stejné lokality. Naproti tomu u vzorků půdy byl odebrán vždy směsný vzorek reprezentující celé pokusné pole. To je důvodem velkého rozdílu mezi variabilitou získaných dat v případě půdy

a v případě rostlin.

Všechny analyzované rostliny vykázaly především dobrou schopnost akumulace kadmia. Quezada-Hinojosa et al. (2015) uvádějí, že vysoké obsahy kadmia v půdě způsobují redukci akumulace kadmia v listech a nadzemní biomase rostliny a zároveň odpovídající nárůst kadmia v kořenech. Dále uvádějí, že to dokazuje, že koncentrace kadmia v rostlinách je proporcionální ku koncentraci kadmia v půdě a nezáleží na druhu rostliny, ale na typu půdy.

Gjorgieva et al. (2010) uvádějí, že pampeliška lékařská, společně například s kopřivou dvoudomou, patří mezi rostliny dobře akumulující kovy, na rozdíl od jiných rostlin. Je zřejmé, že si mnohé rostliny umí dobře regulovat přijaté množství v případě některých rizikových prvků. Příklad této skutečnosti lze vidět v Tabulce 3. u vzorků řebříčku obecného u obsahu Pb, kde je množství přijatého olova na extrémně zamořené lokalitě dokonce nižší než u vzorků ze středně kontaminované lokality, takže se zdá, že poznatky, které publikovali Gjorgieva et al. (2010) jsou aplikovatelné i na další druhy rostlin.

Fišer et al. (2014) a Quezada-Hinojosa et al. (2015) uvádějí, že velké množství rostlin rostoucích na lokalitách s vysokým obsahem rizikových prvků má mechanismy pro omezení vstupu kovu do rostliny nebo také účinné mechanismy detoxikace kovu v kořenech s minimálním přenosem kovu do nadzemní biomasy rostliny. Rozdíl mezi akumulací prvků v kořeni a nadzemní biomase můžeme prezentovat pouze v případě pampelišky, kde toto tvrzení platí v případě olova, ale

u kadmia byly obsahy tohoto prvku v kořeni i v listech srovnatelné, takže dané závěry nelze vztahovat na rizikové prvky obecně.

Opak této regulace je vidět v Tabulce 3. ve vzorcích třezalky skvrnitě a jejich obsahu kadmia, hodnoty tohoto prvku byly ve vzorcích třezalky mnohonásobně vyšší než ve vzorcích ostatních rostlin. Tuto skutečnost potvrzují i Moreno-Jiménez et al. (2009) když uvádí, že v jimi prováděném pokusu byly nalezeny vysoké koncentrace kadmia v nadzemní biomase rostlin třezalky. Tato skutečnost naznačuje, že třezalka by mohla patřit mezi hyperakumulátory kadmia. To potvrzují Král'ová a Masarovičová (2003), které ve své práci uvádějí, že třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.) patří mezi hyperakumulátory kadmia a zinku. Lze tedy předpokládat, že podobné vlastnosti má i jí příbuzná třezalka skvrnitá (*H. maculatum*). Cílené pěstování třezalky společně s rychle rostoucími dřevinami by mohlo na dané lokalitě zvýšit účinnost remediace půdy. Analýza hlavních komponent neprokázala významný vliv ošetření jednotlivých polí nebo přítomnosti dřevin na rostlinný metabolom.

Zdá se však, že obsahy látek i prvků v třezalce mohou být ovlivněny aplikací čistírenského kalu, jak lze vidět v Grafu 5. Silnější závislost na ošetření vykazovaly vzorky lipnice obecné z polí ošetřených kompostem. Lipnice se však nechlubí vysokým obsahem aktivních látek, a tak zde není vliv rizikových prvků na obsah biologicky aktivních látek tak důležitý. Lipnice byla původně vybrána jako běžný zastupitel píce hospodářských zvířat a také jako protiváha léčivým rostlinám. Je zde proto důležitější obsah rizikových prvků než obsah látek. V případě pampelišky se neprojevil jednoznačný vliv ošetření pokusných polí, ale z Grafů 9 a 10 je patrné, že kořen a listy pampelišky nevykazovaly podobné charakteristiky, odezva metabolomu kořenů a listů je tedy odlišná. To potvrzují i výsledky korelační analýzy (Grafy 30-39), která naznačuje, že k významnějším změnám v rostlinném metabolomu (pozitivním i negativním) působením rizikových prvků docházelo zejména v kořeni a nadzemní biomasa byla ovlivněna méně. Pampeliška je považována za vhodný bioindikátor znečištění prostředí kadmíem, protože je schopna růstu i na extrémně kontaminovaných lokalitách (Fröhlichová et al. 2018), ale při expozici extrémním obsahům prvků již je možno zaznamenat morfologické změny tkání kořenů i listů a redukci růstu (Collier et al. 2010, Maleci et al. 2014).

Z grafů korelací rizikových prvků a biologicky aktivních látek v rostlinách je dále patrné, že některé z rostlin nebyly příliš ovlivněny přítomností rizikových prvků, zejména třezalka skvrnitá (Grafy 19-24) a lipnice obecná (Grafy 25-29). Lipnice obecná sice nebyla přítomností prvků příliš ovlivněna, ale přesto v případech, kdy ovlivněna byla, to bylo pozitivně. Lipnice obecná však neobsahuje velké množství biologicky aktivních látek, jak je typické pro lipnicovité rostliny. Poměrně malé ovlivnění rostlinného metabolomu v případě třezalky podporuje výše prezentovanou teorii, že třezalka patří mezi hyperakumulátory kadmia a zvýšené obsahy tohoto prvku metabolismus třezalky významně neovlivňují.

V některých případech nebyl prokázán žádný vliv prvku na rostlinný metabolom, nejčastěji v případě chromu a mědi. Příčinou může být jednak fakt, že se jedná o prvky esenciální (Cu) či prospěšné (Cr), a také fakt, že na dané lokalitě nejsou obsahy těchto prvků v půdě zvýšené (Tabulka 2). Naopak v případě dalšího, rostlinám prospěšného prvku niklu, výsledky ukazují jednoznačně pozitivní vliv na obsah látek v rostlinách, zejména vliv niklu na kořeny i listy pampelišky byl velmi pozitivní. Přestože zinek patří mezi významné esenciální prvky, jeho

vysoké koncentrace v půdě mohou působit fyto toxicky, jak prokázali např. Vysloužilová et al. (2003)

u vrb rostoucích na půdách s obsahem zinku srovnatelným s touto prací. Není proto překvapivé, že rostlinný metabolom reagoval na obsahy zinku v rostlině ve většině případů negativně.

U léčivých rostlin je důležitý zejména obsah těch látek, které mají prokazatelný léčivý účinek. Rostliny by tedy mohly mít kladnější vliv na organismus zvířat jimi krmených, nebo organismus člověka v případě užívání nálevů apod. z léčivých bylin, kvůli vyššímu obsahu biologicky aktivních látek. Gjorgieva et al. (2010) uvádějí, že až 80 % populace spoléhá na užití nekonvenční medicíny na základě léčivých bylin. V organickém zemědělství se uvažuje o cíleném podávání léčivých rostlin hospodářským zvířatům k terapeutickým účelům (Mayer et al. 2014).

Lajayer et al. (2017) uvádějí, že léčivé byliny sice typicky nebývají hyperakumulátory rizikových prvků, a proto nemají tak vysoký fyto remediací potenciál jako jiné rostliny, ale protože jsou často využívány pro získávání silic, a ne pro výrobu krmiv, je jejich využití pro fyto remediaci potenciálně výhodné. Pandey et al. (2019) uvádějí, že vyšší obsah rizikových prvků nemá vliv na složení silic, proto jsou aromatické byliny, z nichž se tyto oleje získávají jako produkt, ideálními kandidáty pro další fyto remediaci (jak už bylo naznačeno v případě třezalky), navíc rizikové prvky při extrakci silic do tohoto produktu nepřecházejí. Otázkou ale zůstává, zda přítomnost rizikových prvků složení těchto silic skutečně významně neovlivní. Například Pisteli et al. (2019) prokázali, že existuje rozdíl ve složení silic různých druhů rostlin (například levandule smilovité) rostoucích v oblasti zatížené rizikovými prvky ve srovnání s kontrolní oblastí. Zaznamenali také nižší výtěžnost silic v rostlinách pocházejících z kontaminované oblasti.

Rostliny rostoucí v kontaminované oblasti mohou také vykazovat vyšší obsahy fenolických látek, jako například flavanoidů, což souvisí s antioxidační odezvou rostlinného metabolismu na zvýšené obsahy rizikových prvků (Daci-Ajvazi et al., 2018). V této souvislosti Vanni et al. (2015) zaznamenali pozitivní korelaci obsahu fenolických látek v rostlinách pampelišky s obsahem zinku v půdě. Podobně Růžicková et al. (2015) zaznamenali zvýšené obsahy antokyanových barviv v rostlinách bazalky právě pěstované v půdě s obsahem rizikových prvků srovnatelných s touto prací. Problematiku vzájemného vztahu obsahových látek v léčivých rostlinách a obsahu rizikových prvků studovali Lajayer et al. (2017). Konstatovali, že role účinných látek rostlin v případné detoxikaci rizikových prvků v rostlinách není ještě detailně prozkoumaná, vzhledem k rozdílným vlastnostem jednotlivých prvků a širokému spektru obsahových látek v rostlinách. Složitost vzájemných vztahů dokumentuje i tato práce.

Problematické zůstává případné využití studovaných léčivých rostlin ve výživě zvířat. Rostliny pěstované na kontaminované půdě mohou mít za určitých podmínek dokonce zvýšené obsahy některých zdravých prospěšných látek, problémem ale zůstávají rizikové prvky obsažené v těchto rostlinách. Jak už bylo uvedeno, obsahy kadmia a v některých případech i olova překračují maximální povolené obsahy těchto prvků v krmivu (Směrnice 2002/32/ES). V případě využití takových rostlin k remediaci kontaminovaných ploch může dojít k ohrožení volně žijících býložravců, kteří by mohli tato místa spásat.

7 Závěr

- Byla provedena analýza vybraných druhů rostlin rostoucích jako bylinný pokryv na pokusném poli, kde probíhá fytoremediace půdy kontaminované rizikovými prvky pomocí rychle rostoucích dřevin.
- V půdách i rostlinách byly stanoveny obsahy Cd, Cu, Cr, Ni, Pb a Zn v rostlinné biomase a v půdách a v rostlinách byla provedena nespecifická analýzy rostlinného metabolomu.
- Způsob ošetření půdy (kompostem, čistírenskými kaly) na jednotlivých úsecích pokusného pole neměl zásadní vliv na obsah rizikových prvků v rostlinách, stejně tak jako přítomnost stromů na pokusných polích nebyla zásadní pro obsah prvků v rostlinách.
- Pokusná pole nebyla v průběhu pokusu již znovu ošetřována čistírenským kalem ani kompostem. Bylo by zajímavé zjistit, zda by případná vícečetná ošetření výsledek pokusu nějak ovlivnila.
- Výsledky prokázaly, že třezalka skvrnitá může být zařazena mezi perspektivní rostliny použitelné pro fytoremediaci půd kontaminovaných kadmíem. V dané lokalitě by společné pěstování rychle rostoucích dřevin a třezalky mohlo zvýšit účinnost remediace.
- Rostliny do jisté míry byly schopny regulovat množství přijatých rizikových prvků.
- Obsah rizikových prvků v mnohých případech pozitivně ovlivnil obsah biologicky aktivních látek v rostlinách, zejména v případě esenciálních a rostlinám prospěšných prvků, jako je Cu, Cr a Ni. Naopak v případě Cd, Pb a Zn reagoval rostlinný metabolom převážně negativně. Byly také zaznamenány rozdíly mezi odezvou metabolomu kořene a listů v případě pampelišky. Dále by bylo možné v budoucích pokusech odebrat i vzorky kořenů dalších rostlinných druhů pro porovnání obsahu prvků a složení obsahových látek v kořenech a v listech.
- Získané výsledky představují jen přibližný odhad reakce organismu rostlin na zvýšený příjem rizikových prvků. Jsou ale návodem pro další výzkum, který by měl směřovat ke kvantifikaci těch obsahových látek, které jsou jednotlivými prvky nejvíce ovlivněny.
- Překážkou využití rostlinné biomasy z oblastí kontaminovaných rizikovými prvky pro výživu zvířat zůstává vysoký obsah těchto prvků v rostlinách.

8 Literatura

- Alloway B.J. 1990. Heavy Metals in Soils. Blackie and Son Ltd., Glasgow and London.
- Amin Mir M, Sawhney SS, Jassal MMS. 2013. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. Wudpecker Journal of Pharmacy and Pharmacology 1:001-005.
- Ayrle H, Mevissen M, Kaske M, Nathues H, Gruetzner N, Melzig M, Walkenhorst M. 2016. Medicinal plants - prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. BMC Veterinary Research 12:89.
- Babička L. 2017. Toxicky významné látky v potravinách. Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, Praha.
- Chinery M. 1998. Flóra a fauna evropy. Nakladatelství Slovart, Praha.
- Collier MH, Keane B., Rogstad SH. 2010. Productivity differences between dandelion (*Taraxacum officinale*; Asteraceae) clones from pollution impacted versus non-impacted soils. Plant and Soil 329:173–183
- Daci-Ajvazi M, Zeneli L, Daci N, Krasniqi A, Ymeri N. 2018. Chemical effects and antioxidant responses of *Urtica dioica* L. extracts growing along highway. Fresenius Environmental Bulletin 27: 172-179
- Dlouhý F. 1902. Léčivé rostliny (Herbář). I. L. Kober, Praha.
- Ekologická ročenka (2003), Kovohut' Příbram.
- Emsley J. 2011. Nature's Building Blocks. Everything you need to know about the elements. Oxford University Press, New York.
- European Union Reference Laboratory (EURL), 2007". Analysis of acidic pesticides in wheat flour samples by LC-MS(/MS) using the QuEChERS Method. CRL for Single Residue Methods, page 1-7.
- Evropský parlament a rada Evropské unie. 2002. SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech Pages 3-14 in Úřední věstník Evropské unie. Lucemburk.
- Favas PJ, Pratas J, Varun M, D'Souza R., Paul MS 2014. Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. In: Hernández-Soriano, M. C. (ed.). Environmental Risk Assessment of Soil Contamination. p. 485-517
- Fišer J, Nováková M, Macek T. 2014. Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků u rostlin. Chemické Listy 108:566-571.
- Fröhlichová A, Száková J, Najmanová J, Tlustoš P. 2018. An assessment of the risk of element contamination of urban and industrial areas using *Taraxacum* sect. *Ruderalia* as a bioindicator. Environmental Monitoring and Assessment. 190: 1-14.

- Gjorgieva D, Kadifkova-Panovska T, Bačeva K, Stafilov T. 2010. Assessment of Heavy Metal Pollution in Republic of Macedonia Using a Plant Assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60:233–240.
- Gjorgieva D, Kadifkova-Panovska T, Bačeva K, Stafilov T. 2010. Content of Toxic and Essential Metals in Medicinal Herbs Growing in Polluted and Unpolluted Areas of Macedonia *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61:297-303.
- Goering PL, Waalkes MP, Klaassen CD. 1995. Toxicology of Cadmium. In: Goyer R.A., Cherian M.G. (eds) *Toxicology of Metals. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 115. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jeon H, Kang H, Jung H, Kang Y, Limb Ch, Kimc Y, Park E. 2008. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *Journal of Ethnopharmacology* 115:82-88.
- Jirásek V, Starý F. 1989. *Kapesní atlas léčivých rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, n.p., Praha.
- Kráľová K, Masarovičová E. 2003. *Hypericum perforatum* L. and *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. – accumulators of some toxic metals. *Pharmazie* 58: 359–360.
- Kubátová P, Hejzman M, Száková J, Vondráčková S, Tlustoš P. 2016. Effects of Sewage Sludge Application on Biomass Production and Concentrations of Cd, Pb and Zn in shoots of *Salix* and *Populus* Clones: Improvement of Phytoremediation Efficiency in Contaminated Soils. Springer Science+Business Media, New York.
- Kubátová P., Száková J., Břendová K., Kroulíková-Vondráčková S., Mercl F., Tlustoš P. 2018 Effects of summer and winter harvesting on element phytoextraction efficiency of *Salix* and *Populus* clones planted on contaminated soil, *International Journal of Phytoremediation*, 20: 499-506.
- Kunzová E, Menšík L, Haberle J, Čermák P, Hangen E, Schilling B. 2015. Kontaminanty v životním prostředí řeky Eger-Ohře. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.
- Lajayer BA, Ghorbanpour M, Nikabadi S. 2017. Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145:377-390.
- Linhart I. 2012. Toxikologie interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
- Liu Y, Wang Z, Zhang J. 2015. *Dietary Chinese Herbs*. Springer-Verlag, Wien.
- Maleci L, Buffa G, Wahsha M, Bini C. 2014. Morphological changes induced by heavy metals in dandelion (*Taraxacum officinale* Web.) growing on mine soils. *Journal of Soils and Sediments* 14:731–743.
- Mayer M, Vogl ChR, Amorena M, Hamburger M, Walkenhorst M. 2014. Treatment of Organic Livestock with Medicinal Plants: A Systematic Review of European Ethnoveterinary Research. *Research in Complementary Medicine* 21:375-386.

Ministerstvo životního prostředí. 2016. Vyhláška ze dne 9. května 2016 o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Pages 2692-2699 in Sbírka zákonů České republiky, 2016, částka 153. Česká republika.

Molata T. 2009. Vliv rozdílných stanovišť na klíčivost nažek pampelišky lékařské (*taraxacum officinale*) [MSc. Thesis]. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno.

Moreno-Jiménez E, Peñalosa JM, Manzano R, Carpena-Ruiz RO, Gamarra R, Esteban E. 2009. Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *Journal of Hazardous Materials* 162:854–859.

Musilová L, Uhlík O, Macková M, Macek T. 2012. Úloha sekundárních metabolitů rostlin v bakteriální degradaci organických xenobiotik. Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, Praha.

Obršálová I, Kukeňová P. 2002. Kompetence ve veřejné správě a možnosti sledování efektivnosti vložených prostředků k ochraně životního prostředí. *Scientific papers of the University of Pardubice. Series D Faculty of Economics and Administration* 7:99-107.

Opatrná M, Součková M. 2003. Pěstujeme okrasné trávy. Brázda, Praha.

Opletal L. 2010. Přírodní látky a jejich biologická aktivita, Svazek 1, Nutraceutika, Primární metabolity a látky obsažené ve strukturovaných biologických systémech. Nakladatelství Karolinum, Praha.

Opletal L. 2016. Přírodní látky a jejich biologická aktivita, Svazek 3, Nutraceutika, Sekundární metabolity rostlin. Nakladatelství Karolinum, Praha.

Opletal L, Šimerda B. 2009. Přírodní látky a jejich biologická aktivita. 3. Metabolity rostlin využitelné pro zlepšení kvality potravin živočišného původu. Ministerstvo zemědělství ČR - Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat Praha - Uhřetěves.

Opletal L, Skřivanová V. 2010. Přírodní látky a jejich biologická aktivita, svazek 2, Využití látek pro ovlivnění fyziologických procesů hospodářských zvířat. Nakladatelství Karolinum Praha.

Pandey J, Verma RK, Singh S. 2019. Suitability of aromatic plants for phytoremediation of heavy metal contaminated areas: a review. *International Journal of Phytoremediation*. 5:405–418.

Pilát A, Ušák O. 1974. Kapesní atlas rostlin. Státní pedagogické nakladatelství, n. p., Praha.

Pistelli L, Bandeira Reidel RV, Parri F, Morelli E, Pistelli L 2019. Chemical composition of essential oil from plants of abandoned mining site of Elba island, *Natural Product Research*, 33:143-147.

Prasad MNV. 2004. Heavy Metal Stress in Plants. From Biomolecules to Ecosystems. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Prasad MNV, de Oliveira Freitas HM. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* **6**: 285-321.
- Pulford ID, Dickinson NM. 2006. Phytoremediation technologies using trees. In: Prasad, M. N. V., Sajwan, K. S., Naidu, R. (eds.). *Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology and bioremediation*. CRC Press. Boca Raton. p. 375-395.
- Quezada-Hinojosa R, Föllmi KB, Gillet F, Matera V. 2015. Cadmium accumulation in six common plant species associated with soils containing high geogenic cadmium concentrations at Le Gurnigel, Swiss Jura Mountains. *Catena* 124:85-96.
- Raduenská M, Šmerková K, Tanhäuserová V, Gumulec J, Hlavna M, Sztalmachová M, Pácal L, Babula P, Adam V, Eckshlager T, Kizek R, Masařík M. 2012. Methalothionein a jeho role v detoxikaci těžkých kovů a predispozici k chorobám. *Praktický Lékař* **92(6)**: 322-326.
- Rieuwerts J., Farago M., Cikrt M., Bencko V. 1999. Heavy metal concentrations in and around households near a secondary lead smelter. *Environmental Monitoring and Assessment* **58**: 317-335.
- Rusalepp L., Raal A., Pussa T and Püssa T, Mäeorg U. 2017. Compariosn of chemical composition of *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* in Estonia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 73:41-46.
- Růžicková P, Száková J, Havlík J, Tlustoš P. 2015. The effect of soil risk element contamination level on the element contents in *Ocimum basilicum* L. *Archives of Environmental Protection* 41:47-53.
- Si X, Zhanga M, Shi Q, Kiyota H. 2006. Chemical Constituents of the Plants in the Genus *Achillea*. *Chemistry & Biodiversity* **3**:1163-1180.
- Skoumalová A, Hrouda L. 2018. *Rostliny naší přírody*. Nakladatelství Academia, Praha.
- Soják J, Čihař J, Zpěvák K. 1983. *Rostliny našich hor - kapesní atlas*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Spilková J, Martin J, Siatka T, Tůmová L, Kašparová M. 2016. *Farmakognozie*. Nakladatelství Karolinum, Praha.
- Steward-Wade SM, Neumann S, Collins LL, Bolland GJ. 2002. The biology of Canadian weeds. 117. *Taraxacum officinale* G. H. Webber ex Wiggers. *Canadian Journal of Plant Science* **82**:825-853.
- Sulborska A, Weryszko-chmielewska E. 2006. Morphology, anatomy and ultrastructure of yarrow (*Achillea millefolium* L.) floral nectaries. *Acta Agrobotanica* **59**:17-28.
- Štulík K. 2006. *Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek*. VŠCHT, Praha.

Vaněk A, Borůvka L, Drábek O, Mihaljevič M, Komárek M 2005. Mobility of lead, zinc and cadmium in alluvial soils heavily polluted by smelting industry. *Plant, Soil and Environment* **51**:316-321.

Vanni G., Cardelli R., Marchini F., Saviozzi A., Guidi L. 2015. Are the physiological and biochemical characteristics in dandelion plants growing in an urban area (Pisa, Italy) indicative of soil pollution? *Water, Air and Soil Pollution* **226**:124.

Vrubel J., Tratinová M., Trojáček P. (1996): Kontaminace zemědělské půdy olovem, kadmiem a arsenem v hospodářském obvodu ZD Sádek se sídlem ve Lhotě u Příbrami. *Ekotoxa Opava*.

Vysloužilová M, Tlustoš P, Száková J, Pavlíková D. 2003. As, Cd, Pb and Zn uptake by *Salix* spp. clones grown in soils enriched by high loads of these elements. *Plant Soil and Environment* **49**: 191-196.

Yarnell E, Abascal C. 2009. Dandelion (*Taraxacum officinale* and *T. mongolicum*). *Integrative medicine* **8**:35-38.

Zeman L. 2006. Výživa a krmení hospodářských zvířat. Profi Press, Praha.

Zicha O. 2012. pampelišky smetánky *Taraxacum* sect. *Ruderalia* Kirschner, H. Ollgaard & Štěpánek. *Biolib*. Available from <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id141471/> (Accessed January 2020).