

Diplomová práce

Akumulace mědi a stresové odpovědi „normálních“ a hyperakumulujících rostlin

Accumulation of copper and stress response of "normal" and hyperaccumulating plants

Lukáš Sedláček

Školitel: RNDr. *et* Mgr. Petr Soudek, Ph.D.

Konzultant : Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.



Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Ústav experimentální botaniky

Akademie věd České republiky

Praha 2009

Především bych chtěl poděkovat RNDr. *et* Mgr. Petru Soudkovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval, za praktické rady při psaní práce a za pomoc v laboratoři. Dále také paní Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za ochotné zaštitění této práce na školní půdě.

Tato práce byla podporována projektem GAČR 522/06/P002, projektem COST FA 0605 (COST.FA0605OC9039) a projektem 2B08058.

Prohlášení

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

V Praze 29.07. 2009

Lukáš Sedláček

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Kontaminanty v půdě	7
2.1.1. Anorganické kontaminanty	7
2.1.2. Organické kontaminanty.....	9
2.2. Odstraňování těžkých kovů	11
2.3. Fytoremediace	12
2.3.1. Definice hyperakumulátorů, indikátorů a druhů tolerantních	12
2.3.2. Klady a zápory fytoremediace	13
2.3.3. Rozdělení fytoremediací.....	14
2.4. Minerální výživa rostlin	17
2.4.1. Mechanismus příjmu.....	17
2.4.2. Příjem těžkých kovů rostlinami a jejich následná akumulace	18
2.5. Měď.....	21
2.5.1. Úvod	21
2.5.1.1. Produkce a použití	21
2.5.2. Měď v životním prostředí	22
2.5.2.1. Půda	22
2.5.2.2. Vodstvo.....	23
2.5.2.3. Sedimenty	24
2.5.2.4. Vzduch.....	25
2.5.3. Měď a rostliny	26
2.5.3.1. Biodostupnost	28
2.5.3.2. Příjem mědi rostlinami	29
2.5.3.3. Transport mědi v rostlině.....	30
2.5.3.4. Toxicita mědi pro rostliny	31
2.5.3.5. Tolerance rostlin k mědi	32
2.5.3.6. Rostliny hyperakumulující a indikující měď	32
2.5.3.7. Remediací kontaminovaných oblastí	33
2.5.4. Shrnutí	33
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1. Cíle práce.....	34
3.2. Botanické charakteristiky použitých rostlinných druhů.....	34
3.2.1. <i>Silene vulgaris</i>	34
3.2.2. <i>Nicotiana tabacum</i>	35
3.2.3. <i>Allium sativum</i>	35
3.2.4. <i>Cucumis sativa</i>	36
3.2.5. <i>Elsholtzia splendens</i>	36
3.2.6. <i>Lupinus albus</i>	37
3.2.7. <i>Lupinus luteolus</i>	38
3.2.8. <i>Hordeum vulgare</i>	38
3.3. Použité látky, chemikálie, přístroje a zařízení	39
3.4. Metodika.....	39
3.4.1. Stanovení měďnatých kationtů v rostlinném materiálu.....	39
3.4.2. Stanovení chlorofylu a karotenoidů.....	40
3.4.3. Stanovení peroxidázy	41
3.4.3.1. Extrakce rostlinného materiálu	41
3.4.3.2. Stanovení enzymové aktivity	41
4. VÝSLEDKY	43

4.1. Akumulace měďnatých iontů	43
4.1.1. <i>Lupinus albus</i>	43
4.1.2. <i>Lupinus luteolus</i>	43
4.1.3. <i>Elsholtzia splendens</i>	44
4.1.4. <i>Hordeum vulgare</i>	44
4.1.5. <i>Allium sativum</i>	51
4.1.6. <i>Cucumis sativa</i>	51
4.1.7. <i>Nicotiana tabacum</i>	51
4.1.8. <i>Silene vulgaris</i>	52
4.2. Stresové odpovědi rostlin na přítomnost měďnatých iontů	58
4.2.1. <i>Obsah fotosyntetických pigmentů</i>	58
4.2.2. <i>Stanovení peroxidásové aktivity</i>	63
5. DISKUZE	70
6. ZÁVĚR	72
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73

Zkratky:

AAS - atomová absorpční spektrometrie

DOC – rozpuštěný organický uhlík

DOM – rozpuštěná organická hmota

ATP – adenosin trifosfát

UV/VIS – ultrafialová/viditelná oblast

EDTA – kyselina ethylendiamin tetraoctová

DTPA – kyselina diethylen triamin pentaoctová

USA – Spojené Státy Americké

PAHy – polyaromatické uhlovodíky

A_r – relativní atomová hmotnost

t_t – teplota tání

t_v – teplota varu

ρ - hustota

S° - absolutní entropie látky ve standardním stavu ($t = 25^\circ\text{C}$ a $p = 101,325 \text{ kPa}$)

X - elektronegativita

A_v – výstupní práce elektronu z prvku

Všechny použité obrázky pocházejí z volně přístupných zdrojů na internetu.

1. ÚVOD

Rozvoj industrializace s sebou přinesl produkci obrovského množství látek, které jsou z velké části pro přírodu nepřírozené a velmi škodlivé. Tyto sloučeniny mají zpravidla velmi dlouhou životnost v životním prostředí. Člověkem jsou zpravidla produkovány pro jejich vhodné vlastnosti či vznikaly jako sekundární produkty při nejrůznějších výroбах. Z postupným rozvojem analytických metod a pokrokem vědy bylo u mnohých „dokonalých“ látek prokázán devastující účinek na nejrůznější složky životního prostředí. Ať již jde například o freony či polychlorované bifenyly.

Antropogenní kontaminace je rozšířena od hlubokých podzemních vod až po stratosféru. Velmi závažným problémem je znečištění půdy, která slouží k produkci plodin, které jsou základní složkou lidské potravy. Proto tyto kontaminace mohou zcela zásadně ovlivňovat zdraví člověka. K odstranění těchto xenobiotik se využívá nejrůznějších dekontaminačních technologií. Mohou daný kontaminant odstranit úplně či jen částečně, *in situ*, *off situ* nebo *ex situ*. Mezi moderní tzv. zelené metody dekontaminace půdy, ale i vody řadíme především fyto-remediace, kterých se týká tato diplomová práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Znečišťování životního prostředí není záležitostí novověku od nástupu průmyslové revoluce, i když je zřejmé, že k velké devastaci došlo právě v tomto období. Již například v době až 1800 let př. n. l. došlo v dnešním Iráku k zasolení a podmáčení půdy intenzivním zemědělstvím. Mezi roky 1400 až 1600 vykáceli Španělé velkou část lesů na Kanárských ostrovech. Okolo roku 1800 došlo v Severní Americe téměř k vyhubení velryb a jiných živočišných druhů. Ve dvacátém století se začaly masivně používat freony a došlo k znatelné redukci ozonové vrstvy. A takto bychom mohli dlouze pokračovat. Taktéž došlo k rozsáhlé kontaminaci půdy anorganickými, organickými a radioaktivními látkami.¹

2.1. Kontaminanty v půdě

Polutanty v půdě mohou být jak organického tak anorganického původu. Speciální kategorii zde tvoří radioaktivní kontaminanty i když spadají pod anorganické polutanty.

2.1.1. Anorganické kontaminanty

Mezi hlavní anorganické kontaminanty půd patří těžké kovy. Jsou to kovy, které mají hustotu větší než 5g/cm^3 (anorganické hledisko) anebo kovy, které jsou toxické pro životní prostředí (ekotoxikologické hledisko). Častými representanty jsou např. rtuť, olovo, kadmium, měď, zinek, chrom, mangan, železo a nikl. Dostávají se do půdy lidskou činností, jako je těžba, zpracování kovů či spalování fosilních paliv, ale mohou se v půdě vyskytovat i přirozeně a to někdy ve značných koncentracích. Tyto kovy se hromadí ve tkáních živých organismů a působí toxicky.

Mezi nejvýznamnější těžké kovy patří² :

- Olovo

Kontaminace olovem prudce vzrůstala v době industrializace. Vysoká koncentrace olova v půdě má velmi nepříznivý vliv na faunu i floru. Fytoremediační techniky se v tomto případě zdají být slibné, jelikož rostliny jako hořčice, kukuřice nebo hrách byli identifikovány jako akumulátory olova. Aplikace chelatačních látek jako například EDTA zvyšuje příjem olova rostlinami. Současný výzkum ukazuje, že hyperakumulace olova je možná u rostlin akumulující olovo upravením půdních podmínek například okyselením, výše zmíněným přidávkou chelatačního činidla a dalších chemických komponent. Alternativou k tomuto postupu, který nemusí být vždy vhodný pro půdní prostředí může být využití geneticky

modifikovaných akumulátorů. Precisní porozumění mechanismu detoxifikace a sekvestrace olova akumulujícími druhy rostlin je nutná k přesnému určení nejvhodnějších dekontaminačních postupů.

- Cadmium

Kadmium je stopový prvek, který nemá dosud žádnou známou biologickou funkci. V současnosti je do životního prostředí deponován především spolu s fosfátovými hnojivy v zemědělství a s odpadními kaly při čištění vody. Také se dostává do životního prostředí z různých průmyslových zdrojů. Kadmium má mnohem horší dopad na faunu než-li na floru. Z běžně dostupných stopových prvků způsobuje u živočichů komplikace v nejnižších koncentracích. Vyznačuje se poměrně vysokou mobilitou a tím pádem se dobře ukládá v potravním řetězci. Velmi snadno se tak dostane až k člověku, což bylo v minulém století zaznamenáno v Japonsku jako tzv. onemocnění *itai-itai*. Kdy došlo u lidí k měknutí kostí, selhávání ledvin a jiným závažným onemocněním. Kadmium tlumí sekreci inzulínu, ovlivňuje metabolismus cukrů atd.

Bylo proto učiněno mnoho pokusů týkající se dekontaminace kadmia. Mezi rostliny použité na dekontaminaci ploch zasažených kadmii můžeme zařadit například *Salix splendens*, *Populus splendens*, *Eucalyptus splendens*

- Arsen

Arsen a jeho sloučeniny jsou známy velice dlouho, stejně jako jeho dvojí účinky. Na jedné straně byl hojně využíván v průmyslu, zemědělství a medicíně a ve velmi malé míře je esenciálním prvkem pro živočichy. Ovšem na druhou stranu ve větší míře je jedem, způsobujícím značné bolesti a následně smrt. Doporučovaný limit pro zemědělskou půdu je doporučován 20 mg/kg a pro pitnou vodu to je 10 µg/L. Bylo dokázáno, že pro flóru esenciální není. Rostliny mohou akumulovat poměrně vysoké koncentrace arsenu, které jsou již pro faunu toxické, jelikož jeho fytotoxicita je nízká. Bylo zjištěno, že řasy v tropických oceánech dokáží dekontaminovat arsen tím, že jej převedou na arsenobetain, který není pro faunu toxický.

- Měď

O mědi je pojednáno dále v samostatné kapitole 2.5.

2.1.2. Organické kontaminanty

Organické kontaminanty se nedají zúžit na specifický soubor látek jako je tomu u anorganických kontaminantů. Jedná se o obrovský počet chemicky různorodých sloučenin. Mezi významné kontaminanty patří nepochybně např. nejrůznější chlorované látky (DDT, PCB aj.) nebo dusíkaté organická látky (výbušniny, atd.). Zde je uveden jen velmi stručný přehled, jelikož anorganické kontaminanty nebyly předmětem této práce.

Příklady organických kontaminantů^{3,4,5,6}:

- PAH (polyaromatické uhlovodíky)

Tato skupina představuje velmi širokou škálu látek, které mají společné to, že ve své molekule obsahují kondenzovaná aromatická jádra a nemají žádné substituenty ani heteroatomy. Jako příklady lze uvést následující rozmanité sloučeniny : benzo(k)fluoranten, indeno(1,2,3-c,d)pyren, naftalen, benzo(b)fluoranten. V čistém stavu jsou to převážně bílé či mírně do žluta zbarvené krystalické látky.

V drtivé většině případů se nevyrábějí cíleně, ale jen pro účely výzkumu a analýz. Výjimku tvoří hlavně antracen a naftalen. Vyskytují se ovšem hojně v celé řadě produktů v průmyslu, ať již jde o motorovou naftu, dehet, asfalt nebo materiály používané při stavbě silnic.

Vznikají při jakémkoliv nedokonalém spalování, kde je přítomný uhlík. Hlavně se tudíž jedná o spalování všech paliv, která obsahují uhlík. Z přírodních imisí lze uvažovat především o erupcích sopek a přirozených požárech. Ovšem antropogenních zdrojů lze nalézt celou řadu :

- výroba hliníku
- uvolňování z materiálů, které obsahují tyto látky
- spalovací procesy
- koksárenství, rafinerie ropy, zplyňování a zkapalňování uhlí

Jsou toxické pro řadu organismů. Způsobují rakovinu, poruchy reprodukce atd. Vyznačují se vysokou persisterancí, což je velmi závažný problém. Jejich nebezpečnost je umocněna tím, že jsou velmi stabilní a mohou se šířit na velmi dlouhé vzdálenosti a ohrožovat i odlehlá území.

- PCB (polychlorované bifenyly)

Polychlorované bifenyly jsou v životním prostředí velmi rozšířené. Jsou to chlorderiváty dibenzenu.. Zahrnují 206 kongenerů (a 3 monochlorované bifenyly), které se od sebe liší počtem a polohou atomů chloru v molekule. Z hlediska průmyslového využití mají výhodné

vlastnosti. Jsou nehořlavé a nevznětlivé, odolné vůči vyšším teplotám, kyselinám, zásadám a oxidaci, jsou málo těkavé, nekorozivní a málo rozpustné ve vodě. Jsou velmi stabilní, velmi dobře rozpustné v tucích. Proto je jejich výskyt v celé biosféře tak hojný. Jejich stabilita, vlastnosti a biologické působení závisí na množství a poloze atomů chloru v bifenyly.

Biodegradabilita PCB :

- klesá se stupněm chlorace (platí i o toxicitě)
- více resistantní, když jsou dva chlory v poloze ortho
- snáze degradují, když mají jeden kruh nesubstituovaný
- začátek degradace probíhá na méně substituovaném kruhu

Jejich biodegradace může nastat pomocí specifických mikroorganismů. Aerobní bakterie atakují přednostně bifenylovou kostru a anaerobní bakterie snižují počet atomů chloru a tím i toxicitu. Nutno dodat, že v současné době se PCB již nevyrábějí, emise pocházejí z používání výrobků a z odpadu s obsahem PCB.

• PCDD & PCDF (polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany)

Polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany jsou chemické sloučeniny, které obsahují ve svých molekulách atomy chloru, vodíku, kyslíku a uhlíku. Jsou málo rozpustné ve vodě, lipofilní, kumulativní a velmi stabilní. PCDD mají 75 a PCDF 135 kongenerů s 1 – 8mi atomy chloru v molekule. PCDD a PCDF nebyly nikdy vyráběny ani používány cíleně. Pouze nepatrná množství byla připravena pro analytické použití, jelikož tyto látky nemají žádné využití. Vznikají převážně při nekontrolovaném hoření široké škály materiálů. Mezi přirozené zdroje můžeme zařadit činné sopky a lesní požáry. Naproti tomu antropogenních zdrojů je celá řada, například :

- spalování materiálů s obsahem chloru
- spalování paliv v automobilech
- průmysl kde dochází k nekontrolovanému spalování (teplárny, železárny, ocelárny)
- papírenský průmysl

Tato skupina látek je velice nebezpečná pro životní prostředí jako celek. Jsou velmi toxické, teratogenní a karcinogenní, s mnoha dalšími toxickými účinky. Do organismu se mohou dostat vdechnutím nebo konzumací kontaminovaných potravin. Tyto látky jsou nebezpečné

již ve stopových množstvích a jde vůbec o nejnebezpečnější látky, které znečišťují životní prostředí.

2.2. Odstraňování těžkých kovů

Metody odstraňování těžkých kovů z půdy se dají rozdělit na :

a) *konvenční metody*

- I. Vytěžení kontaminované půdy a její odvezení na hygienicky chráněnou skládku a její nahrazení půdou čistou.
- II. Vytěžení kontaminované půdy a její promývání speciálními roztoky, které obsahují chelatační činidla (EDTA,...). Ošetřená zemina se poté vrátí nazpátek a těžké kovy se z extraktu odstraní chemicky.

b) *nekonvenční metody*

- I. Mezi tyto metody patří např. elektrokinetické metody. Elektroreklamační se uskutečňuje pomocí účinků stejnosměrného proudu, který se zavádí přímo do kontaminované půdy. V ošetřovaném území se umístí soubory elektrod (anod a katod) přímo do půdy. Průchodem stejnosměrného elektrického proudu dochází v půdě k několika elektrofyzikálním jevům. Jde zejména o elektroforézu, elektroosmózu, elektrolýzu a difúzi. Základní určující veličinou charakterizující tyto elektrokinetické pochody je tzv. pohyblivost iontu. Základním pochodem je elektrolýza.
- II. Na kontaminované půdě se pěstují rostliny, které se nazývají hyperakumulátory (obr. 1 a 2). Tyto rostliny jsou schopny přijímat z půdy kontaminanty ve vysoké míře, aniž by to mělo negativní následky pro jejich prosperitu. Rostliny se na konci svého vegetačního období sklídí, usuší a spálí (nesmí docházet k úletům do ovzduší). Časově je tato metoda náročnější. Tyto procesy se nazývají fyto remediací.⁷

2.3. Fytoremediace

Polutanty, jako těžké kovy a jiná xenobiotika, jsou globálním problémem tím více, čím více roste lidská populace na Zemi. Velkým problémem je znečištění životního prostředí hlavně v rozvojových zemích, kde není kladen takový důraz na ochranu životního prostředí jako je tomu ve vyspělém světě. Rozvoj fytoremediačních technologií k odstranění kontaminantů protomůže významně přispět k řešení tohoto problému.

Fytoremediace je proces, při kterém se využívá schopností rostlin odstranit či stabilizovat kontaminanty v půdě, v sedimentech či v podzemní vodě. Mechanismus fytoremediací zahrnuje biodegradaci pomocí kořenů – rhizofiltraci dále fytoakumulaci, fytodegradaci a fytostabilizaci. Fytoremediace využívají biologické, chemické a fyzikální procesy probíhající v rostlinách a pomocí nich čistí kontaminovaná média. Rostliny degradují toxické organické látky a akumulují těžké kovy ve svých jednotlivých částech. Přehled vybraných druhů rostlin, které se používají při fytoremediačních experimentech jsou uvedeny v tabulce číslo 1.

2.3.1 Definice hyperakumulátorů, indikátorů a druhů tolerantních⁸

Při kategorizaci růstu rostlin na znečištěných půdách se používají v souvislosti s akumulací termíny hyperakumulátory, indikátory a druhy tolerantní.

Indikátory jsou druhy rostlin, které jsou známé již velmi dlouho. Používaly se především dříve při prospekci nalezišť kovů. V padesátých a šedesátých letech minulého století H. Cannon a spol. US Geological Society kategorizovali indikátory a zavedli pojem bioprospecting rud⁹ (Cannon, 1960).

Hromadění kovů v běžných rostlinách je obecně spojeno s význačným poškozením rostliny, jako je např. rozpad homeostázy a není přímo zapojeno do funkcí normálních růstových procesů. Tolerantní druhy mohou přirozeně růst a prosperovat na kontaminovaných půdách, kde většina ostatních druhů růst nemůže. Tolerance je dána různými mechanismy, kterými se rostlina buď brání příjmu toxických látek („excludery“) nebo toxické látky přijímá a ukládá ve vakuolách či zabudovává do buněčné stěny čímž snižuje jejich toxicitu pro organismus („akumulátory“). Zatímco tolerance je podmínkou pro akumulaci, je nutno podotknout, že tolerance a akumulace jsou rozdílné vlastnosti rostlin.

Hyperakumulátory jsou rostliny schopné přijmout kořeny vysoké koncentrace kontaminantů, převážně těžkých kovů, aniž by to mělo negativní dopad na jejich prosperitu. Hyperakumulace se vždy vztahuje ke konkrétním kovům. Než je možno rostlinu označit jako hyperakumulující musí být jasně stanovena výše akumulovaného kovu a jeho metabolizované formy v rostlině. Přehled kovů a jejich hyperakumulátorů je shrnut v tabulce číslo 1.

Tab. 1 : hyperakumulátory těžkých kovů¹⁰

kov	počet známých hyperakumulátorů	druh, čeleď
Cd	1	Brassicaceae
Co	26	Lamiaceae, Scrophulariaceae
Cu	24	Cyperaceae, Poaceae, Lamiaceae
Mn	11	Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteaceae
Ni	290	Brassicaceae, Cunoniaceae, Violaceae
Se	19	Fabaceae
Tl	1	Brassicaceae
Zn	16	Brassicaceae, Violaceae



Obr. 1 : *Brassica juncea*



Obr. 2 : *Thlaspi calaminare*

2.3.2 Klady a zápory fytořediace

Výhody fytořediace :

- hlavní a nespornou výhodou fytořediací je jejich cena oproti konvenčním metodám
- výrazné snížení množství kontaminovaného materiálu (popel z rostlin)
- společensky přijatelná metoda likvidace kontaminantů z půd
- jedná se o metodu *in situ*
- produkce menšího množství druhotných odpadů
- metoda je velmi šetrná k půdnímu prostředí

Nevýhody fytořremediace :

- je limitována hloubkou kontaminantů v půdě
- vysoké koncentrace kontaminantů většinou rostliny poškozují
- klimatické a sezóní jevy ovlivňují růst rostlin, čímž mohou zpomalovat či zastavit řremediaci
- je možný transfer kontaminantů přes média např. z půdy do ovzduší
- není většinou účinná pro silně sorbované kontaminanty např. PCB
- toxicita biodegradačních produktů není vždy známá. Produkt může být mobilizován skrz podzemní vodu a může se akumulovat v organismech. Proto je nutné zkoumat osud různých látek vzniklých řremediací, aby rostliny, které jsou použity pro řremediace neprodukovaly metabolity, které budou škodlivé či škodlivější než látka, kterou řremediovaly.

2.3.3 Rozdělení fytořremediací

Fytořremediace lze podle postupu závislého na charakteru znečištěného prostředí, kontaminantu a jeho koncentraci rozdělit na fytodekontaminační a fytostabilizační technologie:

a) Fytodekontaminační technologie

Do této skupiny patří fytoextrakce, fytodegradace, rhizofiltrace a fytovolatilizace.

- Fytoextrakce (fytoakumulace, fytoabsorpce)

Je založená na absorpci toxických kovů kořeny rostlin a jejich translokaci do nadzemních částí rostliny. Vhodné rostliny se vysází na kontaminovanou půdu a po akumulaci kontaminantů se sklídí a dále upravují, např. tepelně, mikrobiálně či chemicky. Tato metoda se využívá především k odstranění těžkých kovů (jako Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn), ale i polokovů (As, Se), radionuklidů (např. ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{234}U , ^{238}U) a také nekovů (B).

- Fytodegradace

Jedná se o degradaci kontaminantů buď přímo v půdě, nebo v rostlině. Tato metoda je využitelná především pro organické látky, kdy rostliny pomocí enzymů degradují toxické

látky na netoxické. Rostliny vylučují kořeny do okolí látky, které plánovitě slouží jako výživa pro mikroorganismy žijící v rhizosféře. Tyto mikroorganismy naopak produkují pro rostlinu některé sloučeniny, které si rostlina sama nedokáže syntetizovat a zároveň degradují organické látky, které se v půdě vyskytují.

Fytodegradace byly použity pro dekontaminaci např. detergentů, dusíkatých látek včetně výbušnin, chlorovaných pesticidů, PCB, polyaromatických uhlovodíků nebo ropných látek.

- Rhizofiltrace

Tato metoda využívá k dekontaminaci podpovrchové vody čerpané kořeny rostlin. Je vhodná k odstranění nízkých koncentrací kovů, které nelze téměř jinak odstranit. Je také velice vhodná k odstraňování radionuklidů (např. rostliny *Helianthus annuus*). Pro rhizofiltraci některých těžkých kovů jsou vhodné např. kukuřice či rýže.

- Fytovolatilizace

Při fytovolatilizaci dochází k příjmu kontaminantu kořenovým systémem rostlin, transportu do nadzemní části a následné transpiraci těkavého kontaminantu do ovzduší, například některé mikroorganismy umí enzymaticky redukovat rtuťnaté ionty na kovovou rtuť. Gen pro reduktasu rtuti byl vnesen do rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Lyriondendron tulipifera*, u některých následně došlo ke zvýšení odolnosti vůči rtuti (Hg^{2+}) a k transpiraci většího množství rtuti (Hg^0) do ovzduší². Tato metoda je však značně sporná, jelikož se v podstatě jedná o přenesení problému z jedno média (půda) do druhého (ovzduší).

b) Fytostabilizační technologie

Fytostabilizace je metoda, která používá rostliny ke stabilizaci kontaminantů v půdě a podzemní vodě pomocí absorpce a akumulace kořeny, adsorpcí na kořenech nebo srážením v kořenové oblasti rostlin. Tento proces snižuje mobilitu kontaminantu v půdě, zamezuje jeho migraci do spodní vody nebo ovzduší a snižuje jeho biopřístupnost pro vstup do potravního řetězce. Využívá se v místech, kde jsou značné koncentrace xenobiotik (odkaliště,...).

Rostliny stabilizují kontaminanty také ve svých tkáních pomocí redox reakcí, převedením kontaminantu do nerozpustné podoby a nebo zabudováním do svých struktur.

c) Ostatní metody

Existuje i možnost tzv. forenzní fytořediaci¹¹, environmentálního monitoringu (bioassay)¹¹ a fytořediaci⁸.

- *Forenzní fytořediaci* : Některé kontaminované oblasti jsou přirozeně zarostlé. Vegetace může narůst po detoxikaci půdy, kdy dojde k samovolné degradaci kontaminantů. V těchto případech vegetace indikuje, že kontaminanty nejsou již v půdě bioaktivní či toxické. Výzkum přírodních revegetačních míst se označuje jako forenzní fytořediaci, ve kterých má prospěšný význam vegetace. Forenzní fytořediaci vyšetřuje a kvantifikuje přirozené působení fytořediací na kontaminovaných místech.
- *Bioassay* : Testy fytořediaci byly použity k předpovědi rozsahu kontaminace půdy. Rostlinné testy byly úspěšně použity *in situ* ke zjištění rozsahu zamoření půdy arsenem, chromem a mědí. V jiných případech byl zjištěn možný dopad na životní prostředí monitorováním růstu rostlin a jejich absorpcí přítomných těžkých kovů. Bylo také zjištěno znečištění vzduchu z tkáně listů stromů.
- *Fytořediaci* : Tato metoda zahrnuje kompletní řediaci půdy a její naprosté zbavení kontaminantů, kterými byly těžké kovy. Je totiž veliký rozdíl mezi dekontaminací půdy, pro dosažení povoleného limitu znečištění ve srovnání s uvedením půdy do takového stavu, ve kterém může být znovu použita, či k její naprosté dekontaminaci. Objektem mnohých fytořediací projektů je odstranění kontaminantů do takové míry, aby půda nebyla z právního hlediska kontaminována. To ovšem neznamená, že je půda kontaminantů dostatečně zbavena. Trvalou kombinací fytořediací technologií může být dosaženo mnohem větší dekontaminace půdního prostředí. To může pomoci k souběžnému odstranění různých typů kontaminantů z dané oblasti. Řediací systém může např. obsahovat rostliny schopné hyperakumulovat těžké kovy a rostliny stimující aktivitu mikrobů, schopných degradovat některé organické kontaminanty přímo v půdě.

2.4. Minerální výživa rostlin

Rostlina přijímá minerální živiny ve formě iontů z půdního roztoku (hlavně kořenem). To však neznamená, že rostlina nemůže ionty přijímat jinými orgány jako např. listy. Aplikace tekutých hnojiv na listy v rámci pěstitelských technologií to plně potvrzují.

Představa, že rostlina přijímá rozpuštěné látky do svých buněk ve stejné koncentraci, v jakém jsou v půdním roztoku, by byla velmi nesprávná. Není to možné už z toho důvodu, že podíl jednotlivých látek v půdním roztoku naprosto neodpovídá jejich zastoupení v rostlinné biomase. Neregulovaný příjem by velmi rychle vedl ke vzniku toxicity vysokých koncentrací jedněch prvků a k vážnému nedostatku jiných prvků v těle rostliny.

Mechanismus příjmu a transportu iontů musí splňovat tyto základní předpoklady :

- vzhledem k nízké koncentraci většiny iontů v půdním roztoku musí existovat možnost transportu těchto iontů i proti koncentračnímu gradientu
- vzhledem k velkým rozdílům mezi koncentracemi jednotlivých iontů v půdním roztoku a potřebami rostlin musí mít kořeny schopnost regulovat příjem každého iontu odděleně od ostatních¹²

2.4.1 Mechanismus příjmu

Je vysvětlován tzv. pasivním a aktivním transportem

- Pasivní transport

Je uskutečňován ve směru koncentračního spádu. Ionty z půdního roztoku difundují nabobtnalými buněčnými stěnami a jimi pak pronikají do vlastní i sousední buňky. Sorbované ionty se tak mohou pohybovat kořeny, přitom procházejí rostlinnými buňkami, aniž vnikají do jejich vakuol. U většiny kořenů dřevin může voda a v ní rozpuštěné živiny pronikat vnějšími suberinizovanými buňkami korku podél nabobtnalých buněčných stěn a odtud korkovou částí až do xylému. Vnikají-li ionty do kořenů difúzí, mohou tam být vnášeny také transpiračním proudem. Bylo zjištěno, že zvýšením transpirace se zvýšil i příjem minerálních živin.¹³

- Aktivní transport

Jedná se o pohyb iontů proti koncentračnímu spádu za spotřeby ATP, který je pro tento účel hydrolyzován. ATP-ázy se vyskytují ve všech biologických membránách, co se týče přenosu iontů, důležité jsou ATP-ázy cytoplazmatické membrány a tonoplastu, kterým se říká protonové pumpy (transportují H^+).

2.4.2. Příjem těžkých kovů rostlinami a jejich následná akumulace⁸

Rostliny přijímají pomocí kořenů různé ionty vyskytující se v kořenovém substrátu a mají schopnost udržovat jejich koncentraci nižší či vyšší než je v jejich okolí a to za pomoci rostlinných membrán. Transport iontů je možný nejen po koncentračním spádu, ale za vynaložení energie (např. z ATP) i proti němu.

Transportní mechanismy¹⁴ :

- nespecifický transport
 1. prostá difúze
 2. zprostředkovaná difúze

- zprostředkovaný transport
 1. primární aktivní transport
 2. sekundární aktivní transport

Hromadění živin může nastat jen uvnitř relativně semipermeabilních stěn, protože jinak by látky mohly procházet stejně intenzívně do buňky i z buňky. Rostlinné membrány jsou tvořeny formou monomolekulárních vrstev či povrchů (ektoplast, endoplast, plastidomembrána, endoplast apod.) nebo formou systémů složených z vrstev buněk (epidermis, endodermis, karyomembrána atd.). Tloušťka membrány tvořící semipermeabilní hranici pro iontovou difúzi může být kolem 10^{-6} mm.

Selektivita akumulace je závislá na množství a druhu přítomných nosičů schopných způsobit aktivní transport a na permeabilitě buněčných stěn. Akumulace solí v kořenech je obvykle chápána ve dvou fázích :

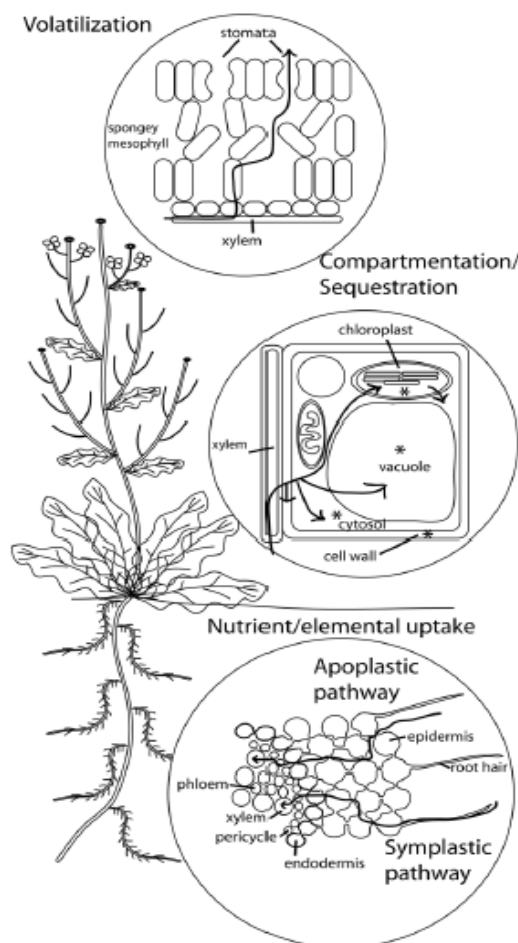
1. Výměnná absorpce, která zahrnuje difúzi a adsorpci iontů. Průběh výměnné absorpce rychle klesá s časem při kterém rostlina vyměňuje ionty s okolním prostředím (vyrovnává se asi za hodinu). Ionty jsou snadno stechiometricky výměnné. K akumulovaným iontům není výměnná adsorpce vysoce selektivní. Není závislá na metabolické energii (probíhá i při nízké teplotě či aeraci půdy). Ionty jsou absorbovány převážně na vazných oblastech cytoplazmy.
2. Metabolická absorpce (akumulace), zahrnuje nosiče iontů a vazné látky – živiny. Průběh metabolické absorpce je pomalejší, trvá hodiny i dny. Ionty nejsou snadno výměnné. K akumulovaným iontům je rostlina vysoce selektivní. Vyžaduje

metabolickou energii, a proto je silně redukována faktory omezujícími respiraci. Ionty jsou akumulovány zejména ve vakuolách.

Nemetabolický absorpční proces je typický zejména pro absorpci a vylučování (výměnu) iontů v kořenovém systému. Zejména pro H_3O^+ a HCO_3^- .

Mnoho těžkých kovů se v půdě nachází ve formě nerozpustných nebo málo rozpustných sloučenin. Aby je rostliny mohly přijmout a následně akumulovat, musí je převést na formu rozpustnou. Možným mechanismem je např. acidifikace rhizosférou. Pomocí látek vylučovaných kořeny rostlin jsou kovy mobilizovány a navázány na vhodné chelatační činidlo. Tento komplex následně pronikne do rostliny přes plasmatickou membránu. Další metodou jak mohou rostliny přijímat těžké kovy je využití mykorrhizy. Příjem těžkého kovu rostlinou je schématicky znázorněn na obrázku číslo 3.

Příjem těžkého kovu, který je v rozpustné formě je možný kořenem dvěma způsoby. Buďto symplasticky buněčnou membránou endodermálních buněk nebo apoplasticky přes volný prostor mezi buňkami (viz. obr. 3).



Obr. 3 : Příjem těžkého kovu rostlinou⁸

Jakmile se dostane těžký kov do xylemu, je transportován do listů, kde proniká do buněk a ukládá se. Typ buněk, ve kterých se těžký kov uloží je různý podle druhu rostliny. Například zinek se v rostlinách *T. caerulea* ukládá především v epidermálních buňkách zatímco u *A. halleri* v mesofyllu¹⁵. Finálním krokem akumulace velké většiny těžkých kovů je jejich uložení ve vakuolách, kam musí být kov či kov-ligand transportován přes membránu. Kov ale může zůstat v buněčné stěně místo aby putoval plazmatickou membránou dovnitř buňky. Ovšem v buněčné stěně může reagovat s polyvalentními kationty¹⁶. Když je kov translokován do nadzemní části rostliny, vstoupí do xylemu a je transportován do listů. Pronikne přes buněčnou membránu do buněk, kde může být zafixován například ve vakuolách nebo buněčné stěně a přeměněn na méně toxickou formu pro rostlinu. Vše záleží na druhu rostliny a na formě, v jaké se daný kov vyskytuje v rostlině. Rovněž může být volatilizován přes stomata v listech.

Těžký kov může být kdykoliv v průběhu své cesty rostlinou přeměněn na méně toxickou formu a to buď chemickou konverzí nebo chelatací. Různé oxidační stavy toxických kovů mohou mít vliv na jejich přijatou koncentraci rostlinou a mohou se lišit následnou sorpcí i toxicitou. Chelatace těchto kovů může měnit jejich ekotoxikologické vlastnosti. Hodně chelatačních činidel obsahuje jako ligand thiolovou skupinu. Biosyntetická cesta síry se ukázala jako velmi důležitá pro hyperakumulační funkci rostlin¹⁷.

Tab. 2 : přehled kovů a komplexů, které mohou být vytvořeny v rostlinách¹⁸

kov, látka	organický ligand
As, PO ₄ ³⁻	fytochelatin, thiol, vit. C, ADP-AS
Cd, Zn, Fe	fytochelatin, tripeptid, thioly, γ -glutamylcystein
Cr, Mn	thioly
Cu	citrát, fytochelatin 2 a 3, metalothionein
Hg	thioly
Ni, Fe	nikotinamin, histidin, thioly, citrát
Pb, Zn, Fe	glutathion
Se, S	cystein, methionin
Zn	fytochelatin, glutathion, thioly, citrát, malát

2.5. Měď

Měď je známá již od konce doby kamenné a je používána lidmi od doby přibližně 4000 př. n. l. Římané objevili významné množství mědi na ostrově Kypru a podle něj je také pojmenován (Kypr = Cuprum = Měď). Základní fyzikální a chemické vlastnosti jsou popsány v tabulce číslo 3.

Tab. 3 : vybrané chemické a fyzikální vlastnosti

veličina	hodnota
A_r	63,546
t_t	1084,5 °C
t_v	2567 °C
ρ	8,96 g/cm ³
X	1,65
S°	33,15 J/K × mol
A_v	4,65 eV

2.5.1. Úvod

Měď se vyskytuje v zemské vrstvě v koncentracích mezi 25 až 75 mg/kg. Má vysokou afinitu k síře, proto se vyskytuje hlavně jako chalkopyrit $CuFeS_2$, bornit Cu_5FeS_4 , chalkocit Cu_2S , covellit CuS . Další skupina zahrnuje zoxidované minerály obsahující měď, které se formují hlavně během zvětrávání hornin, obsahující sulfidy mědi. Zde je měď ve formě oxidů nebo hydroxosloučenin jako např. cuprit Cu_2O , tenarit CuO , malachit $Cu_2CO_3(OH)_2$ a azurit $Cu_2(CO_3)_2(OH)_2$. Dále se měď velmi často vyskytuje ve formě sfaleritu ZnS , pyritu FeS a galenitu PbS . Vyskytuje se převážně v kyselých půdách.

2.5.1.1. Produkce a použití

Hlavní světová produkce se zvýšila z 9,2 Mt v roce 1990 na 13,3 Mt v roce 2003¹⁹. Ve dvacátém století dramaticky vzrostlo její využití a v současnosti se těží na všech šesti kontinentech. Díky jejím všestranným vlastnostem má širokou škálu použití. Nejvíce mědi se používá na výrobu vodivých materiálů v elektrotechnice, dále při výrobě motorů,

elektrospotřebičů, mincí atd. V automobilovém průmyslu byla částečně nahrazena hliníkem. V elektrotechnice částečnou náhradou vedení optickými vlákny či mikrovlnami.

Další nezanedbatelné množství mědi je v pesticidech a fungicidech, které se používají v zemědělství. Díky jejím bakteriostatickým vlastnostem se také přidává do krmiva pro dobytek a drůbež.

2.5.2. Měď v životním prostředí

Obsah mědi v životním prostředí je velmi variabilní. Drtivá většina mědi je antropogenního původu. Ať je to již ze sléváren, používáním mědi v elektrotechnice nebo jejímu přidávání do fungicidů. Proto byla tato kapitola rozčleněna do čtyř celků, jelikož v každém z těchto prostředí představuje rozdílné nebezpečí, vyskytuje se v jiných formách a její koncentrace a biodostupnost jsou taktéž rozdílné.

2.5.2.1. Půda

Souhrnná hodnota pro průměrný obsah mědi v různých druzích půd po celém světě je v rozmezí 20 až 30 mg/kg zeminy²⁰. Nicméně hodnoty pod 10 mg/kg jsou velmi časté, takže globální koncentrace mědi je často citována v rozpětí od 8 mg/kg v kyselých písčitých půdách do 80 mg/kg v těžkých hlinitých půdách²¹. Jiné zdroje²² uvádějí rozpětí mezi 2 až 250 mg/kg. Obvykle je kumulována v horních několika centimetrech zeminy ale má tendenci být adsorbována organickými sloučeninami, karbonáty, jílem a oxyhydroxidy manganu a železa v hlubší vrstvě půdy²³.

Obsah mědi v půdě tedy úzce souvisí s prostorovým uspořádáním částic a obvykle nejvyšší obsah je v lehkých písčitých půdách a naopak nejvyšší je v hlinitých půdách. Průměrný obsah mědi států Evropské Unie je mezi 10 – 30 mg/kg.^{24, 25}

Ve většině půd je ve formě $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ iontu adsorbována na jílovité části nebo organické komponenty. V závislosti na pH půdy se může vyskytovat v různých formách jako např. Cu^{2+} , Cu^+ , $\text{Cu}(\text{Cl}_2)^-$, CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, CuCO_3 , CuCl atd.²⁰ Chování mědi v půdě úzce souvisí na pH a koncentraci. Ponizovsky²⁶ vypočítal, že drtivá většina mědi je sorbována a jen okolo jednoho procenta zůstává volně.

Chování, fytodostupnost a toxicita mědi je rozdílná pro různé rostlinné druhy a není pouhou funkcí koncentrace²⁷. Rozpustnost mědi a tím pádem její biodostupnost ovlivňuje celá řada

parametrů jako jsou např. pH, oxidačně-redukční potenciál, textura půdy, teplota, vodní režim atd. Mobilitu mědi výrazně snižují velké minerální koloidní částice tvořené oxyhydroxidy železa a hliníku obalené oxyhydroxidovými částicemi železa, manganu a hliníku a organickou hmotou²⁸. Rozpuštěná organická hmota (DOM) má velikou afinitu k mědi a tím pádem jí fixuje a znemožňuje její pohyb. Tato skutečnost přispívá k formování rozpustných organických komplexů mědi.²⁹ V minerálních půdách je přirozený úbytek mědi díky substituci mědi za vápník v kalcitu, který je přítomný ve vápnatých půdách a v ostatních zeminách precipitací $\text{Cu}(\text{OH})_2$ a / nebo $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$.³⁰ Nedostatek mědi v rostlinách byl zaznamenáván již v devatenáctém století²⁰. Nedostatek mědi v půdě ovšem úzce souvisí se způsobem hospodaření na zemědělských půdách. Nedostatkem mědi nejčastěji trpí půdy s hrubou strukturou a vysokým pH, půdy s vyšším obsahem vápníku a zeminy bohaté na organický materiál.

Protože ve většině půd je měď málo mobilní, její dlouhodobé koncentrace jsou velmi stálé. Pozitivní pro Českou Republiku je zjištění, že deprese mědi do zemědělské půdy, kde se chová skot je u nás jedna z nejnižších v Evropě, pouhých 29 g za rok na hektar půdy. Naopak nejvyšší deprese byla naměřena v Itálii a to 2771 g za rok na hektar. Byly dokonce zaznamenány i záporné hodnoty a to ve Švýcarsku úbytek 17 g za rok na hektar a v Norsku 138 g za rok na hektar. Obsah mědi v půdě, kde se pěstují rostliny je o poznání menší a v některých oblastech byl zaznamenán úbytek mědi z vrchní části půdy až do hodnoty 54 g za rok na hektar v Norsku. Ale například na vinicích a v odkalištích v Itálii byly zaznamenány hodnoty 13923 g za rok na hektar, respektive 3905 g za rok na hektar. Přitom maximální povolená deprese mědi v orné půdě je v evropské unii 12 kilogramů za rok na hektar. Bezpečné hodnoty mědi v různých typech půdy byly stanoveny následovně, jíl 100 mg/kg, hlína 60 mg/kg a písek 30 mg/kg.³²

2.5.2.2. Vodstvo

Průměrná koncentrace v severním Pacifickém oceánu je 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vody.³⁴ Průměrná koncentrace pro všechny oceány byla naměřena 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.³⁵

Rozdílnost koncentrací mědi v oceánech a potažmo v jakémkoliv vodstvu je přímo závislá na pH. Například koncentrace hydroxidu měďnatého vzroste o 90% při změně pH ze sedmi na osm celých šest. Nejběžněji se měď v oceánské vodě vyskytuje ve formě hydroxidu měďnatého, uhličitanu měďnatého a měďnatého kationtu.³⁶ V povrchových vodách je měď většinou zastoupena také v těchto sloučeninách plus ještě ve formě síranu měďnatého.³⁷ Do

pobřežní vody se měď dostává z mnoha různých zdrojů. Bylo spočítáno, že příjem mědi Baltickým mořem je 1300 tun transportem z řek a 1200 tun atmosférickou deposicí. Celkem tedy 2500 tun mědi za rok z čehož 82% pochází z antropogenních zdrojů.³⁸

Průměrná světová koncentrace mědi v řekách se udává 1,48 µg/kg a její roční průtok řekami je 55 kt/rok³⁹.

Vznik sloučenin mědi ve vodě je velmi důležitým ukazatelem při kontrole biogeochemických procesů a také biodostupnosti.⁴⁰ V čisté vodě je rozpustnost solí mědi pod jejím redukčním potenciálem, který je dán faktory jako pH, teplota, tvrdost vody, hustotou přítomných částic a mnoha dalšími faktory.⁴¹ V mořské vodě je měď zastoupena především ve dvou sloučeninách, a to jako hydroxo-chlorid měďnatý a hydroxid měďnatý. Brügmann zaznamenal, že měď se vyskytuje v mořské vodě v organické i anorganické formě přibližně ve stejném množství, ale ve vzorcích, které byly odebrány ve větších hloubkách byla měď převážně v anorganické formě.⁴²

Koncentrace mědi ve vodstvu je v dynamické rovnováze s jejím obsahem v podložních sedimentech. Měď ve spodních sedimentech má vazbu na minerální podloží a nebo je těsně vázána na organickou hmotu.⁴³ Dostupná data naznačují, že v přírodní vodě a v sedimentech se měď nachází zpravidla ve vázané formě.⁴⁴

Povolené limity mědi v pitné vodě se v různých státech velmi liší, od 0,04 µg/l až 3µg/l. Nicméně ve většině evropských státech je limit stanoven na 0,05 µg/l.⁴⁵ Limitní hodnota navržená USEPA v roce 2002 může být v některých vodách mírně překročena. Vyšší hodnoty mědi v pitné vodě mohou být důsledkem změny pH a tvrdosti vody. Měď se také do pitné vody může dostávat ze starého vodovodního řadu.

2.5.2.3. Sedimenty

V mnoha oblastech sedimenty řek nebo jezer mohou klesnout pod vrstvu mědi a tím dojde k jejímu malému uvolnění do vody. Zvýšené koncentrace mědi byly obvykle pozorovány v blízkosti sléváren, měděných dolů nebo kanalizačních výpustí. Zvýšené koncentrace v povrchové vrstvě sedimentů byly zaznamenány následovně pro kontaminované a nekontaminované oblasti v tabulce číslo 4 a 5.

Tab. 4 : vybrané kontaminované oblasti³¹

místo	stát	průměrná koncentrace
řeka podlíz Chenaie	Indie	760 až 939 mg/kg
vysoce průmyslová oblast	Polsko	17 - 278 mg/kg
jezero poblíž Ni-Cu dolu	Rusko	905 mg/kg
jezero poblíž slévárny	Švédsko	2000 mg/kg
jihozápadní prům. region	Anglie	590 mg/kg

Tab. 5 : vybrané nekontaminované oblasti³¹

místo	stát	průměrná koncentrace
jezero Asososca	Nikaragua	36 až 74 mg/kg
jezero Roznowskie	Polsko	18 - 39 mg/kg
horské řeky	Wales	7 - 70 mg/kg
období sucha / období dešťů	Libanon	57 / 107 mg/kg
horní Ganga	Indie	31 mg/kg

2.5.2.4. Vzduch

Obsah mědi ve vzduchu má velmi široké rozpětí hodnot, od 0,03 do 0,06 ng/m³ v oblastech okolo jižního pólu až k hodnotám 4900 ng/m³ v průmyslových oblastech Německa.³ Hodnota 4 ng/m³ je brána jako přirozené pozadí.⁴⁶ Průměrná koncentrace v oblastech nedotčených průmyslem je brána 2,6 ng/m³.³⁵

Globální emise mědi pro rok 1983 byly v rozpětí 20 až 51 kt, v roce 1995 to bylo 35 kt, což lze označit za mírný pokles.⁴⁷ Díky striktní regulaci imisí a používáním lepších technologií byl antropogenní přírůstek mědi v ovzduší v posledních letech významně snížen. Toto bylo potvrzeno sledováním obsahu mědi v lišejnících v Norsku. Mezi léty 1990 – 1995 se množství mědi pohybovalo okolo hodnot 7 mg/kg, dříve byla tato hodnota téměř trojnásobná (dosahovala hodnot 20 mg/kg).⁴⁸ Dokonce i v Grónsku byly naměřeny hodnoty okolo 11,2 mg/kg.⁴⁹

Deposice mědi ve vybraných evropských státech je v rozmezí hodnot od 5 do 100 g za rok na hektar a průměrná hodnota je 34 g za rok na hektar. Nejnížší hodnoty byly zaznamenány ve Finsku a naopak nejvyšší v Rakousku, jak lze vidět v tabulce číslo 8.⁵⁰

Antropogenní zdroje mědi v atmosféře zahrnují slévárny jak železných tak ovšem i neželezných rud, výroby tepla a elektrické energie využívající spalování fosilních paliv,

vysoké pece a hutní průmysl jako celek, cementárny, odkaliště atd.⁵¹ Přírodními zdroji mědi v přírodě jsou zvětrávací procesy, vulkanická činnost, termální prameny a popel z požárů. Měď je v ovzduší ve formě oxidů, které mají velkou afinitu k prachovým částicím a poměrně snadno se rozpouštějí při dešti. Oxidy mědi také velice ochotně reagují s oxidy síry a proto koncentrace oxidů mědi v okolí tavících pecí, například v Arizoně v USA, koreluje s přítomností síry.⁵²

Tab. 6 : deponice mědi v zemědělské půdě ve vybraných státech EU

země	deponice (g/ha×rok)
Rakousko	100
Belgie	7
Dánsko	8
Finsko	5
Německo	53
Maďarsko	62
Irsko	13
Itálie	60
Norsko	12
Polsko	40
Švédsko	15
Švýcarsko	18
Holandsko	27
Velká Británie	25
evropský průměr	34

2.5.3. Měď a rostliny

Obsah mědi v rostlinách je velmi variabilní a je ovlivňován řadou faktorů, ze kterých jsou nejdůležitější mobilita/imobilita mědi v půdě a dále vlastnosti rostlin. Stejně druhy zemědělských plodin z různých míst světa obsahují přibližně stejné koncentrace mědi. Například obsah mědi v pšeničných zrnech byl změřen v rozmezí hodnot od 3,8 až do 6,7 mg/kg a pro listnatou zeleninu od 3 do 8 mg/kg. Vyšší koncentrace mědi byly zjištěny v travinách, hodnoty od 2 do 10 mg/kg, u jetele byla tato hodnota ještě o něco vyšší a to od 7 do 15 mg/kg. Podrobnější údaje jsou uvedeny v tabulce číslo 9.

Většina projektů se zabývala zkoumáním obsahu mědi v zemědělských rostlinách, jelikož denní příjem mědi člověkem je tvořen z jedné třetiny právě zeleninou a ovocem.⁵³

Měď je, jak již bylo zmíněno, esenciálním prvkem pro rostliny. Vyskytuje se v některých enzymech a je důležitá pro fyziologické funkce jako jsou fotosyntéza a dýchání, metabolismus cukrů a dusíku, rozmnožování a odolnost proti chorobám.

Nedostatek mědi silně ovlivňuje tyto fyziologické procesy a tím pádem také reprodukci. Tento nedostatek je poměrně častý a v mnoha případech se nijak neprojevuje navenek. Alloway²⁰ napsal, že nedostatek mědi v rostlinách je všudypřítomným jevem a mnohem větším problémem v Evropě než ve zbytku světa. Toto je spojeno hlavně s typem půd, klimatickými podmínkami a vývojem rostlin. Na tento nedostatek je velmi citlivá například pšenice, oves, slunečnice, vojtěška, mrkev, hlávkový salát, špenát, cibule a citrusy.

V rostlinách je měď jen velmi málo mobilní, jelikož je velmi silně vázána na dusík a některé proteiny. Při nedostatku mědi mohou rostliny po krátkou dobu růst normálně, ale po delším čase dojde ke špatné redistribuci mědi ze starých listů a kořenů v důsledku chlorózy a nekróze nejmladších výhonků.

Rostliny rostoucí na mědi kontaminované půdě mají tendenci k zvýšené akumulaci mědi, zejména blízko průmyslových oblastí a na místech ošetřených herbicidy obsahující měď.⁵⁴ Kávovníky rostoucí v Africe na půdě ošetřované herbicidy s přídavkem mědi obsahovaly velké množství naakumulované mědi, konkrétně více jak 1000 mg/kg v kůře, 400 mg/kg v listech a 150 mg/kg v kořenech.⁵⁵ Lesní stromy jako kupříkladu borovice rostoucí nedaleko tavící pece na měď ve Finsku obsahovaly taktéž velká množství mědi. V kůře to bylo 1500 mg/kg, v lýku 66 mg/kg, ve dřevě 11 mg/kg a v jehličí 500 mg/kg.⁵⁶

V kořenech, potažmo v rhizosféře se měď vyskytuje v komplexní formě, ale její příjem a translokace je funkcí reaktivity měďnatého kationtu. Pokud je celková koncentrace mědi v půdě mezi 25 – 40 mg/kg a pH pod 5,5 tak je měď toxická pro mnoho vyšších rostlin.⁵⁷ Hodnota pH hraje velmi významnou roli při dostupnosti a při toxicitě mědi.

Některé rostliny z čeledi mátovitých jako například *Aeolanthus bifirmifolius* a *Becium homblei* jsou velmi dobré indikátory přítomnosti mědi v půdě, rostou velice hojně tam, kde je obsah mědi v půdě mezi 1000 – 13 700 mg/kg.⁵⁸

Tab. 7 : obsah mědi v travinách a v jeteli v některých státech⁵⁹

země	traviny rozpětí (mg/kg)	traviny průměr (mg/kg)	jetel rozpětí (mg/kg)	jetel průměr (mg/kg)
Kanada	-	5	-	-
Finsko	3,8 - 4,8	4,3	-	-
Německo	7,4 - 15	10	7,6 - 15	10,5
Maďarsko	3,6 - 8,4	5	4,2 - 16,2	10,5
Japonsko	1,3 - 33	6,9	2 - 12,5	6,5
Polsko	2,2 - 21	6	4,2 - 21	11,3
Nový Zéland	7,3 - 13,4	10,5	8,1 - 17,5	11,7
USA	1,5 - 18,5	9,6	10,0 - 29	16,2
bažina	1,1 - 3,8	1,8	8,8 - 20	12,5
stepní les	1,1 - 3,9	2,6	5,1 - 24	14,8

2.5.3.1. Biodostupnost

Biodostupnost, mobilita a možná toxicita závisí na koncentraci v půdním roztoku, na přirozené asociaci s ostatními ionty a schopnosti uvolňovat měďnaté kationty ze sorbované fáze. Existuje množství rovnovážných modelů predikujících vznik vodné fáze s kationty těžkých kovů, tyto modely jsou důležité pro předvídání rychlosti jakou se budou doplňovat odebrané kationty z půdního roztoku kationty, které jsou sorbované.

Celkový obsah mědi se dá rozdělit do celkem šesti kategorií⁶⁰ :

1. rozpustné ionty, anorganické a organické komplexy
2. měď uvolněná z pevné fáze
3. stabilní organické komplexy mědi v humusu
4. měď absorbovaná v jílových částicích
5. měď ve formě hydroxidů železa, manganu a hliníku
6. měď, která je vázána v krystalových mřížkách minerálů

Obsah mědi ve svrchní vrstvě půdy je velmi nízký, díky jejím vazbám popsaným výše. Měření schopnosti rostlin přijímat měď často zahrnuje nejen rozpustnou formu, ale také podíl, který je v půdě pevně vázán. To vede k problémům s korelací množství celkového obsahu mědi odstraněné rostlinami v různých formách. Distribuce těžkých kovů mezi různými fázemi v půdě je velmi důležitá při posuzování schopnosti půdy zásobovat rostliny těmito mikronutrienty. Kationty těžkých kovů mohou být přítomné v rozpustné formě, vázané v komplexech s organickou hmotou či hydro-oxidy a nebo imobilizovány v minerálních strukturách. Vykreslení této frakcionalizace mědi je základním předpokladem k porozumění její mobility, biodostupnosti a toxicity.⁶¹ Krishnamurti a Naidu⁶² se zaměřili na studium

vzniku rozpustné formy mědi v půdních roztocích a její frakcionalizaci mezi fázemi v několika nekontaminovaných oblastech Austrálie. Ve skleníkových pokusech s pšenicí bylo zjištěno, že příjem mědi rostlinami přímo koreluje s přítomností kyseliny fulvinové.

Růst rostlin může také ovlivňovat přítomnost mědi. Experimenty provedené Romkensem⁶³, který pěstoval měď tolerantní *Agrostis capillaris* v půdě kontaminované mědí ukázal, že přítomnost mědi pozitivně ovlivnila růst kořenů. V přítomnosti rostlin byla rozpustnost mědi o dva řády nižší než v půdě bez přítomnosti rostlin. Toto bylo doprovázeno významnou změnou pH, zvýšením rozpustných DOC a zvýšenou přítomností vápníku. Tyto faktory jsou považovány za hlavní příčiny redukce nestabilního podílu mědi.

Jednou z možností jak zjistit množství mědi v půdě, které jsou rostliny schopné přijmout je použití DGT (diffusion gradient thin film) elektrod. Tato metoda funguje podobně jako kořeny rostlin, ve kterých je nižší koncentrace mědi než v jejich okolí a simuluje taktéž zásobování kořenů okolními kovy.⁶⁴ Tato technika byla aplikována na sérii 29 venkovních pokusů s velkou koncentrační škálou.⁶⁵ Byla zjištěna lineární korelace obsahu mědi v listech rostliny *Lepidium heterophyllum* na všech 29 místech. Tento vztah, ale nebyl pozorován mezi celkovým obsahem mědi v rostlinách a obsahem mědi v půdě. Toxicita mědi se projevovala tam, kde byla její koncentrace nameřená výše zmíněnou metodou vyšší než $2\text{mg} \times \text{l}^{-1}$. Tato práce ukázala, že výše zmíněná metoda vylučuje započítání silně komplexovaných kovů a koloidní fáze, zatímco biodostupný podíl uvolňuje z pevné fáze a tím pádem ho můžeme změřit. Z tohoto plyne, že se tato metoda dá využít jako universální metoda k zjišťování pouze biodostupného podílu mědi v půdě.

2.5.3.2. Příjem mědi rostlinami

Měď má v metabolismu rostlin specifické postavení. Je totiž mikronutrientem, jehož nedostatek vede k vážným poruchám metabolismu, biosyntézy a růstu rostlin. Na druhou stranu ovšem přílišné koncentrace mědi jsou pro rostliny toxické, jelikož má vysokou afinitu k řadě organických molekul, její redoxní vlastnosti narušují transfery elektronů v různých reakcích a v neposlední řadě taktéž generuje volné kyslíkaté radikály. Většina proteinů, vyžadujících měď je traslokována v cytoplasmě. Koordinace příjmu, ukládání a transportu je elementární pro potřebnou koncentraci mědi v dané části rostliny, v rozdílných tkáních atd.⁶⁶

Měď se v rostlinách vyskytuje v různých formách. Poté co je přijata rostlinou je jen po dobu přibližně jedné minuty ve volné formě jako hydrát. Déle už se vyskytuje v buňkách jen ve formě různých druhů ligandů, se kterými buňky mezi sebou „obchodují“, čímž dále dochází

ke vzniku komplexovaných forem.⁶⁷ Tato těsná kontrola její mobility vyžaduje přítomnost specifického distribučního systému, který se o toto vše stará. Pro měď toto zajišťují z velké části tzv. metalochaperony, které byly zjištěny v kvasinkách, ale i v rostlinných buňkách.⁶⁸ Dva geny pro tyto látky byly zaznamenány v rostlinném druhu *Arabidopsis*, jmenovitě to byly tzv. Copper Chaperone (CCH) a Responsive to Antagonist 1 (RAN1), které jsou zapojeny do sekvestrace volné mědi v cytoplasmatu a jejího následného transportu do Golgiho aparátu.⁶⁹ Tato cesta mohla být vyvinuta k transportu mědi z odumřelých listů zpět do metabolismu aktivních částí rostliny.

Mobilisace kovů v rhizosféře je dobře známý jev. Měď prostupuje membránami ve formě měďnatého kationtu, ovšem přesný transportér (-y) nejsou v tomto případě doposud známy.⁷⁰ Víme, že transportní kapacita membrán, které může být pro měď dosaženo, je mnohem vyšší než je potřeba pro dostatečné zásobování rostlin. Homeostáze může být dosaženo mnohem lépe v rhizosféře, než-li v samotných kořenech. Měď může být redukována redukčním systémem pro železo.⁷¹ Nicméně v půdě převládá organická forma mědi, která je pro tento redukční systém nedostačujícím substrátem. Z toho je zřejmé, že toto nebude mít na biodostupnost mědi velký vliv.⁷²

Po takovéto mobilisaci mědi musí nutně následovat její zachycení buňkami kořenů. Měď je nejprve navázána na buněčnou stěnu, která se vyznačuje nízkou afinitou a malou selektivitou. Díky této nízké afinitě prostupuje dále přes plasmatickou membránu dovnitř do buňky. Velmi důležitou roli zde hraje také negativní membránový potenciál, který je v buňkách na povrchu kořene mínus 200mV. Díky tomuto potenciálu jsou kladně nabitě kationty přitahovány poměrně velkou silou.⁷³ Poznatky z poslední doby taktéž zmiňují přítomnost speciální ATPázy v plasmatické membráně se selektivitou k mědi. Tento transport nadbytečné mědi uvnitř cytoplasmy je zprostředkován přítomnými chaperony.⁷⁴

Pokud množství mědi v rostlinách začne významně stoupat, rostlina začne produkovat zvýšené množství fytochelatinů.⁷⁵ Rostliny, které mají nedostatek fytochelatinů a nedokáží je ve zvýšené míře v případě potřeby produkovat jsou k mědi vysoce sensitivní.⁷⁶ Bylo taktéž provedeno několik pokusů jak vyvolat produkci fytochelatinů expresí genů pro syntézu glutathionu, bohužel jen s velmi malým úspěchem.⁷⁷

2.5.3.3. Transport mědi v rostlině

Počáteční transport mědi v kořenech je skrze apoplast. Volný pohyb uvnitř mezibuněčné prostoru je možný pouze mimo endoderm. V endodermu jsou totiž přítomné suberizované buňky, které slouží jako bariéra volné difuze.⁷⁸

Pohyb symplastickou cestou směrem ke xylemu je regulován třemi procesy. První je chelatace mědi uvnitř kořenových buněk, druhá cesta zprostředkovává transport symplastem v cévním systému a poslední uvolňuje měď do xylemové mízy. Měď může být chelatována v buněčných vakuolách nebo může být začleněna do biochemických cyklů kořenových parenchymatických buněk. Pohyb v cévním systému rostlin není úplně objasněn a není mnoho známo o možných transportních cestách. Transport iontů v xylemu je proces kontrolovaný membránovými proteiny.⁷⁹ Je známo, že měď dříve než se dostane do xylemu je chelatována například nikotinamidem, který tvoří s mědí stabilní komplexy^{80, 81}.

Na konci její cesty v listech je v rozpustné formě ve všech buňkách apoplastu, kde může být použita v aktivním metabolismu. Nebo může vstoupit do symplastu navázána na povrchu buněk a být uvolněna zpátky do apoplastu a putovat do epidermu.⁸²

Při prostupnosti mědi hraje významnou roli xylem, kde je translokováno mnoho funkčních skupin, které brání prostupu jako například karboxylové skupiny. Tyto bariéry jsou obcházeny tvorbou komplexních sloučenin s anionty či s organickými ligandy. Bylo zjištěno, že měď upřednostňuje komplexní formy s asparaginem, glutaminem a histidinem.^{83,84} Podle jiné studie se jeví vhodným taktéž amid kyseliny nikotinové. Při pokusu s divokou odrůdou rajčat bylo zjištěno, že při jejich vystavení mědi dojde k významnému zvýšení koncentrace tohoto amidu.⁸⁵

Export mědi z listů je pomocí floemu. Přesto tento proces není úplně popsán díky protichůdným zjištěním.⁸⁶ Studium množství mědi uloženého v listech, které se dynamicky mění jak rostlina roste, bylo odhaleno, že nastal 40%ní úbytek mědi během růstu podzemní části cibule. Měď byla také zjištěna ve floemové míze.⁸⁷

2.5.3.4. Toxicita mědi pro rostliny

Jak již bylo zmíněno, měď je velmi důležitá pro správný růst rostlin. Je esenciální pro řadu proteinů ať již ve fotosyntéze (plastocyanin) nebo v dýchacím řetězci (cytochrom oxidasa).⁸⁸ Její vysoké koncentrace jsou ovšem velmi toxické pro všechny vyšší rostliny. Mění permeabilitu membrán, strukturu chromatinu, syntézu proteinů, enzymovou aktivitu, fotosyntetické a respirační pochody a může způsobovat předčasné stárnutí.^{89,90,91} Toto všechno bylo prokázáno v řadě studií.^{89, 92, 93, 94}

I při zvýšených koncentracích mědi v půdě nebyla její koncentrace v listech signifikantní.⁹⁵ V této studii byla také prokázána zvýšená produkce askorbátu a glutathionu ve fazolích při zvýšené expozici mědi. Jedná se o antioxidační obranný mechanismus rostlin. Přítomnost glutathionu při zvýšení stresu byla taktéž zjištěna u rostlin druhu *Arabidopsis*. Zde také bylo objeveno, že zvýšené koncentrace mědi neměly vliv na produkci fytochelatinů.⁹⁶ Při pokusu s pěstováním rostlin na pastvinách obklopujících továrny bylo prokázáno, že rostliny nevykazovaly žádné negativní jevy při zvýšené koncentraci mědi v ovzduší.⁹⁷

2.5.3.5. Tolerance rostlin k mědi

Mezi rostlinné druhy, které projevily toleranci k mědi řadíme například *Agrostis tenuis*, *Festuca rubra*, *Silene splendens*, *Mimulus* a pár druhů mechů jako je *Pohlia nutant*.^{98, 99}

U rostlin rodu *Silene* bylo zaznamenáno, že se brání přítomnosti mědi jejím vylučováním pomocí cytoplasmatické membrány kořenových buněk.¹⁰⁰ Pokus byl proveden na třech druzích rostlin rodu *Silene*. ATP-dependentní odtok mědi byl zaznamenán u druhu, který rostl přirozeně na místě se zvýšenou koncentrací mědi.

Tolerance k mědi byla taktéž zaznamenána u polovodních jednoděložných rostlin. Jmenovitě to byla rostlina *Phragmites communis*, *Typha latifolia*, *Glyceria fluitans*.^{101, 102, 103, 104}

2.5.3.6. Rostliny hyperakumulující a indikující měď

Jasně důkazy o existenci hyperakumulátorů mědi nemáme. Podle definice hyperakumulátor mědi musí být schopen přijmout nejméně 1 mg mědi na gram sušiny listů.¹⁰⁵

Jistá existence hyperakumulátorů mědi byla zaznamenána v oblasti Shaban v Demokratické Republice Kongo.¹⁰⁶ Ovšem hyperakumulační schopnost nebyla prokázána v laboratorních podmínkách.

Mezi nejznámější indikátory mědi patří rostliny, které se taktéž nacházejí v oblasti Shaban. Konkrétně jde o *Haumaniastrum katangense* a *Aeollanthus biformifolius*. Oba dva rostlinné druhy byly testovány v laboratorních podmínkách kde se ukázalo, že jde o typické excludery.¹⁰⁷

Mezi indikační rostliny pro měď patří také pár druhů mechů, některé z nich rostou výhradně na půdě bohaté na měď.⁹⁹ Nejznámějšími jsou takzvané měděné mechy z rodu *Mielichhoferia* a *Scopelophila*.¹⁰⁸

2.5.3.7. Remediaci kontaminovaných oblastí

Bylo provedeno několik studií, které se zabývaly remediací ploch kontaminovaných mědí. Z provedených pokusů v reálných podmínkách bylo dosaženo nejlepších výsledků při inkorporaci organické hmoty. Byly použity dřevné odštěpky a kompost v kontaminované lesní půdě blízko slévárny produkující měď a nikl. Během tří let vzrostla koncentrace komplexované mědi a naproti tomu poklesl biodostupný podíl mědi. Nastal také rozvoj bakteriálních populací, ale jejich tolerance k mědi poklesla.^{33, 109}

Jiné studie zabývající se remediací se zaměřili na inkorporaci anorganických matric. McBride a Martinez¹¹⁰ se zaměřili na využití oxidu železitého, oxidu manganatého, hydroxidu železnatého, hydroxidu hlinitého a přísady organické hmoty ve formě rašeliny v oblasti kontaminované mědí dlouhodobým používáním fungicidů. Jejich experiment ukázal, že přítomnost oxidu manganatého a hydroxidu železitého významně napomohla poklesu biodostupného podílu měďnatých kationtů. Za což s největší pravděpodobností mohla změna pH v půdě.

Byly také vyzkoušeny syntetické zeolity, kde byl prokázán pokles podílu mědi schopného extrakce do vody po dobu nejméně dvanácti měsíců. Data pro delší časový úsek nejsou známa.¹¹¹

Všechna dostupná data ovšem zatím stále mluví ve prospěch konvenčních metod co se účinnosti odstranění mědi týče.

2.5.4. Shrnutí

Jak již bylo zmíněno, měď je zajímavá tím, že na jedné straně je pro rostliny esenciální, ale na druhé straně její zvýšené koncentrace jim prokazatelně škodí. Měď nepředstavuje až tak velké riziko pro člověka jako většina ostatních těžkých kovů. Proto se většinou sahá k její pouhé imobilisaci v půdě, kdy se stane pro organismy nedostupná a tím pádem netoxická. U remediací mědi nemáme tolik poznatků jako u ostatních těžkých kovů (As, Zn, Pb nebo Cd).

Koncentrace mědi v přírodě stoupají zejména díky stále se zvyšujícímu množství fungicidů, které se používají hlavně v tropických a sub-tropických oblastech a obsahují vysoké koncentrace mědi. V současné době se pracuje na vývoji fungicidů na organické bázi, ovšem je otázkou, zda se při jejich vyšší ceně uplatní na trhu. Z tohoto vyplývá, že problém s kontaminací mědí bude rok od roku narůstat a proto je výzkum v oblasti její remediace důležitý.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Cíle práce

- Testovat schopnost akumulace mědi u osmi rostlinných druhů v hydroponických podmínkách.
- U vybraných rostlinných druhů stanovit vliv mědi na obsah fotosyntetických pigmentů v listech .
- Učinit pokusy se dvěma vybranými rostlinnými druhy na přítomnost peroxidázy a zjistit vliv mědi na její obsah v rostlinách.

3.2. Botanické charakteristiky použitých rostlinných druhů

K porovnání bylo zvoleno osm následujících rostlinných druhů. Všechny rostliny jsou schopné růst ve středoevropských klimatických podmínkách a nejedná se o geneticky upravené druhy.

3.2.1. *Silene vulgaris* (čeled' *Caryophyllaceae* *Juss.* – **hvozdíkovité**)¹¹²

Silene vulgaris je vytrvalá trsnatá rostlina, která dorůstá výšky až osmdesát centimetrů.



Obr. 3 *Silene vulgaris*

Lodyha je větvená, oblá a holá. Má celokrajné kopinaté listy protažené do špičky. Jejím květenstvím je vidlan, květy jsou obvykle oboupohlavné. Pestík má tři blizny a deset tyčinek. Korunní plátky jsou větší, bílé, hluboce laločnaté. Kalich je nápadně nafouklý, dvacetizilný, s četnými anastomózami. Semena jsou ledvinovitá. Kveté od června do října. Roste na kamenitých místech, podél cest, na suchých trávnících a okraji křovin. Jejimi přirozenými místy výskytu je celá Evropa, Severozápadní Afrika. Izolovaně ovšem roste téměř po celém světě.

3.2.2. *Nicotiana tabacum* (čeleď *Solanaceae* – lilkovité)¹¹³

Nicotiana tabacum má listy široce kopinaté, řapík křídlatě rozšířený. Květy jsou růžové až



Obr. 4 *Nicotiana tabacum*

červené s trubkovitými až nálevkovitými korunami. Tento rod zahrnuje asi sto druhů domácích převážně v Jižní Americe, na Sundských ostrovech, v Austrálii a Oceánii. Nyní se řada z nich pěstuje ve všech světadílech od rovníku až do teplejších oblastí mírného pásu, mnoho z nich jako okrasné zahradní i skleníkové rostliny. V České Republice se může pěstovat na Jižní Moravě, dále se dá nalézt v různých zahradách a na zahrádkách kde se pěstuje jako ozdobná rostlina. Tabák vyžaduje pro pěstování teplé prostředí, proto se mu daří na teplých a slunných stanovištích, se střední roční teplotou nad patnácti stupňů celsia a průměrnými ročními srážkami asi šestsetpadesát milimetrů.

3.2.3. *Allium sativum* (čeleď *Alliaceae* – liliovité)¹¹⁴

Allium sativum je vytrvalá rostlina se složenou stlačeně kulovitou cibulí. Cibule se dělí na



obr. 5 *Allium sativum*

několik dužnatých šupin (stroužků), které jsou kryty společným obalem bílé až purpurové barvy. Při oddělení stroužků je možno takto česnek vegetativně rozmnožovat. Stonek je na průřezu oblý, asi do jedné poloviny krytý pochvami listů. Listy jsou jednoduché, přisedlé, s listovými pochvami. Čepele jsou celokrajné, ploché, široce čárkovité, na rubu kýlnaté, se souběžnou žilnatinou. Květy jsou vrcholičnaté, květenství, které se nazývá šroubel je podepřeno toulcem, který brzy opadá. V květenství jsou skoro vždy přítomny pacibulky, které slouží k

vegetativnímu rozmnožování, zpravidla je v květenství daleko méně květů než pacibulek. Okvětí se skládá ze šesti okvětních lístků zelenavě bílé až růžové barvy, řidčeji jsou bílé nebo nachové. Tyčinek je šest, tyčinky vnějšího a vnitřního kruhu jsou rozdílné, nitky vnitřních jsou zakončeny dvěma dlouhými zuby. Plodem je tobolka. Česnek pochází ze střední Asie.¹ Obsahuje 65 % vody, 26 % organických bezdusíkatých látek, 7 % dusíkatých látek, 1,5% minerálních látek a 0,1 - 0,5 % éterických olejů. Cibule také skrývají sirný glykosid alliin, který se působením enzymů alliinázy, aliin - liazy, arginázy, mirozinázy a jiných mění na antisepticky (protibakteriálně) působící allicin. Allicin dále snižuje hladinu krevních lipidů a dodává česneku typický zápach.¹¹⁵

3.2.4. *Cucumis sativa* (čeled' Cucurbitaceae – tykvovité)¹¹⁶

Cucumis sativa pochází z Indie a patří k nejstarším kulturním rostlinám. V současnosti je však



Obr. 6 *Cucumis sativa*

rozšířena na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Je to jednoletá až vytrvalá bylina. Stonek je hranatá lodyha dosahující i několika metrů. Její květy mají zvonovitý tvar žluté barvy. Obsahuje proteolytické enzymy a vitamíny B1, B2 a C. Přibližné složení je 3,5 - 4 % sušiny, 0,7 % bílkovin, 0,2 % tuků, 2,7 % cukrů - 0,5 % glukóza, 0,4 % fruktóza, 0,2 % sacharóza, 0,2 % pektinové látky, 0,2 % hemicelulóza a 0,6 % celulóza. Nejlépe se jim daří v teplých, chráněných polohách kukuřičné nebo řepašské oblasti do nadmořské výšky dvěstěosmdesáti metrů.

3.2.5. *Elsholtzia splendens* (čeled' Lamiacea – pyskaté)^{121, 122}

Elsholtzia splendens zahrnuje okolo třiceti druhů rostlin od opadavých polokeřů po byliny.



Obr. 7 *Elsholtzia splendens*

Původ mají v Číně, Indii, Jávě. A nejvíce zastoupeny jsou v Asii. Rostliny jsou šedesát centimetrů vysoké. Listy jsou dlouhé řapíkaté a zubaté, dva až osm a půl centimetru dlouhé a osm milimetrů až dva a půl centimetru široké. Kvetou od září do října. Roste ve vlhké šterkovité půdě. Výskyt byl zaznamenán až do tří tisíc čtyř set metrů nad mořem.

3.2.6. *Lupinus albus* (čeleď *Boletaceae* – bobovité)^{119, 120}



Obr. 8 *Lupinus albus*

Lupinus albus je jednoletá velkosemenná rostlina původem z jižní Evropy. Výška rostlin je okolo jednoho metru. Kulový kořen proniká do značné hloubky. Vyznačuje se větším množstvím postranních kořenů. Stonky vlčího bobu jsou vzpřímené a chlupaté. Listy dlanitě mnohočetné, lístky čárkovité, širší. Květenstvím je vrcholový hrozen, barva květů bílá až žlutobílá. Květy se vyznačují příjemnou vůní. Plodem je dlouhý ochlupacený lusk, který obsahuje čtyři až osm velkých a zploštělých semen. Semena lupiny mají vysoký obsah dusíkatých látek (30 – 40%) s poměrně vysokým zastoupením lysinu. Lupina obsahuje také antinutriční látky, z nichž nejvýznamnější je zastoupení chinolisinových alkaloidů.

3.2.7. *Lupinus luteolus* (čeleď *Boletaceae* – bobovité)^{119, 120}



Obr. 9 *Lupinus luteolus*

Lupinus luteolus je jednoletá velkosemenná rostlina původem z jižní Evropy. Výška rostlin je šedesát až sto centimetrů. Lodyha je přímá. Listy má dlanitodělené, mnohočetné, lístky užší. Květenstvím je vrcholový hrozen a barva květů je žlutá. Plodem je dlouhý, řídko ochlupacený lusk, který obsahuje čtyři až osm drobnějších vejčitých semen žlutobílé až bílé barvy. Obsah látek je stejný jako u vličího bobu bílého.

3.2.8. *Hordeum vulgare* (čeleď *Poaceae* – lipnicovité)^{117, 118}

Hordeum vulgare patří mezi nejstarší zemědělské plodiny. Vyskytuje se již v čínské a indické



Obr. 10 *Hordeum vulgare*

mytologii, archeologicky je doložena již v prehistorických dobách v Evropě, Asii a Africe. Severní hranice pěstování ječmene sahá až za polární kruh (Norsko, Sibiř). V Tibetu a v Andách je ječmen pěstován v nadmořských výškách přesahujících čtyři tisíce metrů. Ječmen je jednoletá převážně samosprašná rostlina jarního i ozimého charakteru. Dělí se na dvou a víceřadé. Ječmen dosahuje výšky až stovacet centimetrů. Listy mají malý jazýček a dlouhá překřížená ouška. Květenstvím je osinatý i bezosinný lichoklas. Zrno je pluchaté i nahé, slámově žluté a vrásčité. Obsahuje vysoký podíl sacharidů a vitamínů skupin B a E.

3.3. Použité látky, chemikálie, přístroje a zařízení

- Destilovaná voda
- Dusičnan měďnatý trihydrát (Lachema)
- Kyselina sírová 98% p.a. (PENTA)
- Kyselina dusičná 65% p.a. (PENTA)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (PENTA)
- Kyselina chloristá 65% p.a. (PENTA)
- Methanol >99,9% (Analytika s r.o.)
- Kapalný dusík (Linde Gas a.s.)
- Chelaton III dihydrát (Lachema)
- váhy, KERN 410
- Lyofilizátor LABCONCO, USA
- Spektrometr UV/VIS Shimadzu
- AAS SensAA dual, GBC Scientific Equipment
- Mineralizační box
- laboratorní sklo
- automatické pipety, DIALAB
- odstředivka Hettich Universal 32 R

3.4. Metodika

3.4.1. Stanovení měďnatých kationtů v rostlinném materiálu

Rostliny, které byly použity pro experimenty, byly pěstovány v Perlitu a po dosažení požadované velikosti byly omyty a poté vloženy do Erlenmayerových baněk s hydroponickým médiem.. Rostliny byly dále kultivovány v hydroponickém Hoaglandovu médiu (přesné složení viz tab. 9) s přísadkou mědi o různých koncentracích.

V baňkách bylo vždy 300 ml hydroponického média a měď ve formě dusičnanu. Tyto baňky byly potaženy vrstvou alobalu, aby se zamezilo přístupu světla, což značně snižuje růst řas na kořenech rostlin. Experimenty byly prováděny ve skleníku, který byl přisvětlován sodíkovými vysokotlakými výbojkami.

Pro každou koncentraci byly vždy v první, třetí, sedmý a čtrnáctý den odebrány tři rostliny od každého druhu. Následně byly rozděleny na kořen, stonek a list a lyofilizovány. Po vysušení byla každá část přesně zvážena na analytických vahách, dána do zkumavky s 5ti ml

mineralizační směsi kyselin viz tabulka číslo 11 a vložena do mineralizačního bloku. Vzorčky byly pozvolna zahřívány na teplotu od 60°C do 195°C po dobu několika hodin. Po vychladnutí bylo následně přidáno 2,5ml 20%ní kyseliny chlorovodíkové a vzorčky povařeny po dobu 1,5 h při teplotě okolo 85°C.

Po zchladnutí byly vzorčky analyticky převedeny do plastových centrifugačních zkumavek a doplněny na objem 10ti ml. V této fázi byly již připraveny k samotnému měření na atomové absorpční spektroskopii.

Tab. 8 složení Hoaglandova média

	látka	konc. látky v médiu (mg/l)
makronutrienty	MgSO ₄ × 7H ₂ O	369,7
	K ₂ SO ₄	348,51
	CaCl ₂ × 2H ₂ O	588,07
fosfátový pufr pH 5,5	NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	291,73
	Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	46,56
mikronutrienty	H ₃ BO ₃	8,58
	MnSO ₄ × 4H ₂ O	4,64
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,66
	CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,82
	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,06
železo	FeSO ₄ × 7H ₂ O	17,92
dusík	NaNO ₃	339,98
	NH ₄ Cl	213,97
	NH ₄ NO ₃	160,09

Tab. 9 složení mineralizační kyseliny

látka	objem látky v zásobním roztoku (ml/l)
kyselina dusičná, p.a. 65%	850
kyselina chloristá, p.a. 70%	130
destilovaná voda	20

3.4.2. Stanovení chlorofilu a karotenoidů

Listy rostlin (*Elsholtzia splendens* a *Allium sativum*) byly ihned umístěny do mrazáku s teplotou minus 80°C. Následně byly takto uchovaná rostlinné vzorčky zváženy na analytických vahách a vloženy do připravených centrifugačních zkumavek, které byly

následně doplněny na objem 5 ml čistým methanolem. Po dobu extrakce (cca 3 dny) byly vzorky uchovány v temnu v chladničce při teplotě 4°C.

Po vyextrahování byly vzorky změřeny na UV/VIS spektrofotometru při třech vlnových délkách. Konkrétně šlo o vlnové délky 470 nm, 652,4 nm a 665,2 nm. Takto získaná data byla dosazena do třech rovnic¹²³ a vypočítán obsah barviv v miligramech :

- chlorofyl *a* = $(16,72 \times A_{665,2}) - (9,16 \times A_{652,4})$
- chlorofyl *b* = $(34,09 \times A_{652,4}) - (15,28 \times A_{665,2})$
- karotenoidy = $1000 \times A_{470} - 1,63 \times \text{chlorofyl } a - 104,96 \times \text{chlorofyl } b / 221$

3.4.3. Stanovení peroxidázy

3.4.3.1. Extrakce rostlinného materiálu

Rostlinný materiál byl rozdrcen v třecí misce v kapalném dusíku spolu s 0,1M Tris pufrem (hodnota pH byla upravena pomocí HCl na 7,8), který obsahoval 1mM EDTA a 1mM dithiotreitol (DTT). Dále byl přidán nerozpustný polyvinylpyrolidon (PVP). Získaný extrakt byl odstředěn (cca 45 minut) při 4000 otáčkách za minutu. Čirý supernatant byl odebrán do mikrozkuvek a uchován v ledničce při teplotě 4°C až do doby před vlastním měřením.

3.4.3.2. Stanovení enzymové aktivity

Aktivita enzymů byla stanovena měřením rychlosti přeměny substrátu na produkt detekovatelný při vhodné vlnové délce na spektrofotometru. Enzymová aktivita byla vypočtena podle Lambert-Beerova zákona :

$$\Delta c / \Delta t = \Delta A / \Delta t \times \epsilon \times d$$

$$EA = \Delta c / \Delta t = \Delta A \times V / \Delta t \times \epsilon \times d \times v$$

EA enzymová aktivita (U/ml)

V celkový objem vzorku (ml)

ϵ molární absorpční koeficient ($\text{dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

ΔA změna absorbance

Δt změna času (min)

d šířka kyvety

v objem vzorku enzymu pipetovaný do kyvety (ml)

Δc změna koncentrace substrátu

Jednotka U vyjadřuje konverzi 1 μmol substrátu za 1 minutu.

Reaktanty byly odpipetovány do kyvety a vlastní reakce byla odstartována přidavkem peroxidu vodíku. Kyveta byla následně ihned vložena do spektrofotometru a byla měřena časová závislost absorbance vzorku. Aktivita enzymů pak byla vypočtena podle výše uvedeného vzorce. Konečné hodnoty aktivit byly vztaženy na obsah proteinů.

Složení reakční směsi, příslušné vlnové délky a extinkční koeficienty pro měření enzymové aktivity jsou uvedeny v tabulce číslo 12.

Tab. 10 Složení reakční směsi pro měření enzymové aktivity

enzym	reakční směs	λ (nm)	ϵ (Mm³ × cm⁻¹)
peroxidasa ABTS ¹²⁴	0,85 ml citrát-fosfátového pufru (pH 4,6) 0,05 ml 3,6 mM ABTS 0,05 ml 10 mM H ₂ O ₂ 0,05 ml extraktu	405	31,1
peroxidasa guajakol ¹²⁵	0,745 ml 10mM K-fosfátového pufru (pH 5,8) 0,05 200 mM guajakol 0,05 ml 100 mM H ₂ O ₂ 0,005 ml extraktu	470	26,6

K-fosfátový pufr obsahuje K₂HPO₄ a KH₂O₄ v poměru 1:10 a je upravený na požadovanou hodnotu pH pomocí H₃PO₄ nebo KOH.

4. VÝSLEDKY

4.1. Akumulace měďnatých iontů

Předpěstované kultury osmi druhů rostlin (*Lupinus albus*, *Lupinus luteolus*, *Elsholtzia splendens*, *Hordeum vulgare*, *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris*) byly kultivovány v hydroponickém médiu s přidavkem soli mědi o třech různých koncentracích (50, 250 a 500 mM). Kultivace probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml. Vzorky rostlin pro stanovení obsahu mědi byly odebírány po 1, 3, 7 a 14 dnech.

4.1.1. *Lupinus albus*

Obsah mědi v kořenovém systému je silně závislý na její koncentraci v kultivačním médiu a na době kultivace. Nejvyšší množství mědi bylo nalezeno v kořenech rostlin pěstovaných na médiu s 500 mM Cu^{2+} (po 14 dnech až 14 mg/g sušiny). Také ve stoncích bylo nejvíce mědi po 14 dnech při koncentraci 500 mM Cu^{2+} (cca 0,7 mg/g sušiny). Při koncentraci 50 mM Cu^{2+} se množství mědi příliš nelišilo od kontrolních vzorků, pouze po 14 dnech se koncentrace ve stoncích ztrojnásobila. Transport mědi do listů byl velmi pozvolný a nejvíce mědi bylo nalezeno v rostlinách kultivovaných v médiu s 250 mM Cu^{2+} nebo 500 mM Cu^{2+} . V případě koncentrace 500 mM Cu^{2+} byl počáteční nárůst množství mědi v listech mnohem rychlejší než při 250 mM Cu^{2+} , ale po třech dnech se množství stabilizovalo a projevila se toxicita mědi žloutnutím, vadnutím a zasycháním listů. Při koncentraci 50 mM Cu^{2+} nebyly rozdíly proti kontrolním rostlinám v počáteční fázi kultivace signifikantní, ale po 7 a 14 dnech došlo k jejímu mírnému nárůstu v listech v porovnání s kontrolou.

4.1.2. *Lupinus luteolus*

Pro kořenový systém této rostliny, zvláště při vyšších koncentracích, měla měď devastující účinek. Je to patrné také z grafů pro všechny tři koncentrace. Nejvyšší akumulace byla zaznamenána v případě koncentrace 250 mM Cu^{2+} (cca 10 mg/g sušiny), ale stejně jako v případě koncentrace 500 mM Cu^{2+} (cca 8 mg/g sušiny), byly tyto vysoké koncentrace naměřeny v rostlinách po 3 dnech. Množství mědi po 7 a 14 dnech se postupně snižovalo. Při koncentraci 50 mM Cu^{2+} bylo maximum naměřeno až po 7 dnech. Ve stoncích bylo nalezeno asi desetkrát méně mědi než v kořenech, přičemž při koncentracích 250 mM Cu^{2+} a 500 mM Cu^{2+} bylo množství mědi na srovnatelné úrovni. U rostlin kultivovaných v médiu s obsahem 50 mM Cu^{2+} bylo množství mědi ve stoncích srovnatelné s kontrolními rostlinami. Podobný

trend byl patrný taktéž u listů. Přítomnost mědi v médiu (koncentrace 50 mM Cu^{2+} a 250 mM Cu^{2+}) neměla na obsah mědi v listech výrazný vliv. Pouze v případě koncentrace 500 mM Cu^{2+} bylo pozorováno zvýšení množství v listech po 14 dnech kultivace (cca 0,18 mg/g sušiny).

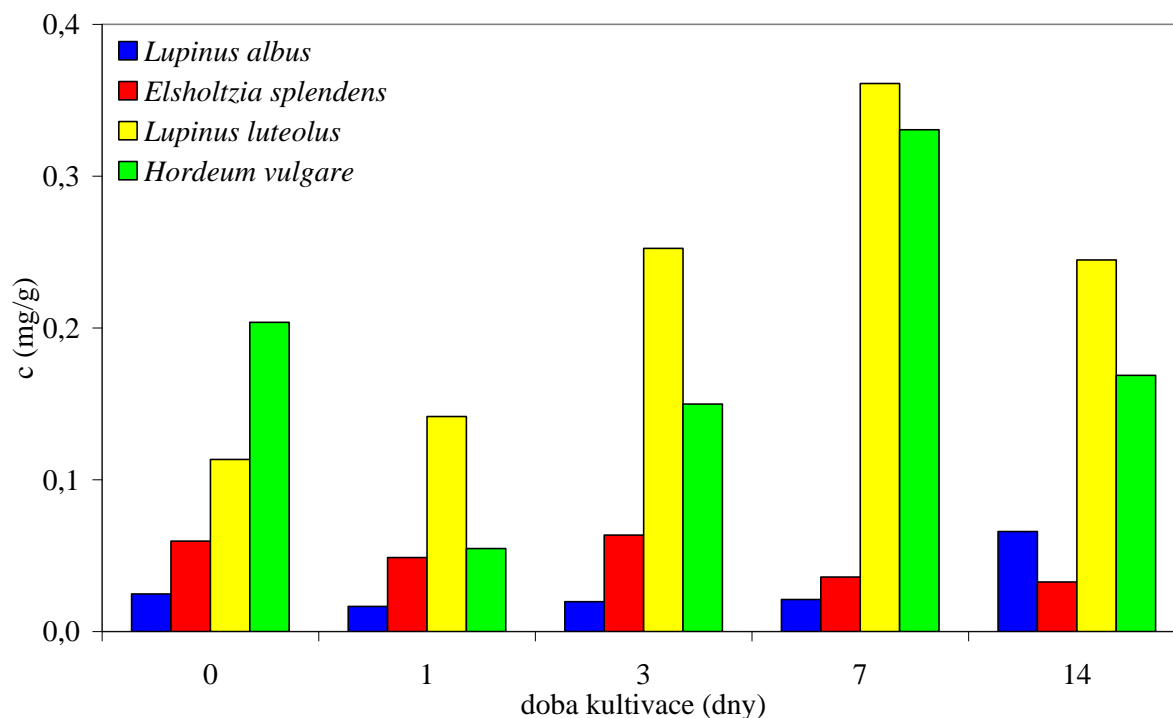
4.1.3. *Elsholtzia splendens*

Kořeny elsholtzie nebyly schopny akumulovat měď ve vysokých koncentracích. Nejvyšší obsah mědi (cca 3 mg/g sušiny) byl nalezen u rostlin kultivovaných v médiu obsahujícím 250 mM Cu^{2+} nebo 500 mM Cu^{2+} . Nebyla ale pozorována výrazná časová závislost akumulace. Měď byla po prvním dni naakumulována a v průběhu další kultivace se její množství udržovalo na přibližně stejné úrovni. Stonek rostlin kultivovaných při nízké koncentraci (50 mM Cu^{2+}) obsahoval množství mědi srovnatelné s kontrolou. Pouze vysokých koncentracích (250 mM Cu^{2+} a 500 mM Cu^{2+}) docházelo k nárůstu obsahu mědi s dobou kultivace. Množství mědi akumulované ve stoncích bylo až okolo 0,5 mg/g sušiny. Do listů nebyla měď prakticky transportována při žádné testované koncentraci a její množství je srovnatelné s kontrolními rostlinami.

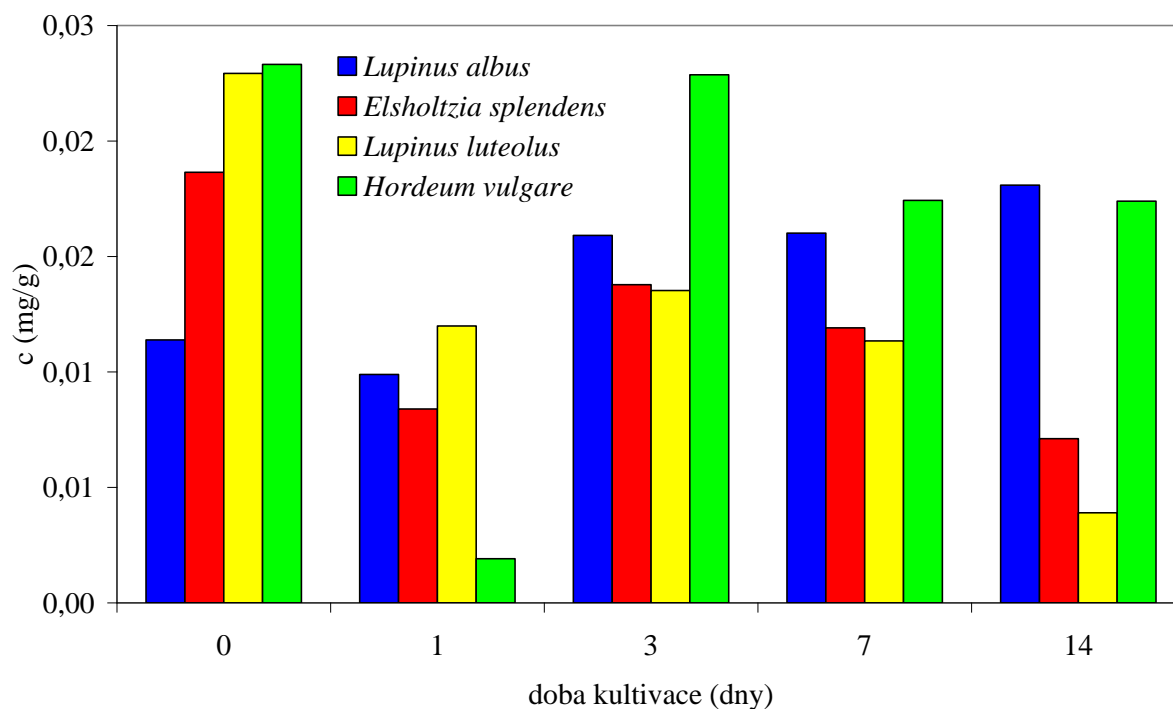
4.1.4. *Hordeum vulgare*

Akumulace mědi v kořenech a stoncích ječmene probíhala pozvolna a v prvním a třetím dni kultivace byl její obsah srovnatelný s kontrolními rostlinami. Po 7 a 14 dnech byl nárůst množství mědi v kořeni výraznější pro všechny testované koncentrace. Nejvíce mědi bylo stanoveno v kořenech rostlin kultivovaných v médiu 500 mM Cu^{2+} po 7 dnech (cca 8 mg/g sušiny). Po 14 dnech se množství mědi při této koncentraci výrazně snížilo, protože docházelo k úhynu rostlin. Ve stoncích nedocházelo při koncentraci 50 mM Cu^{2+} k významnější akumulaci mědi v porovnání s kontrolními rostlinami. Při vyšších koncentracích (250 mM Cu^{2+} a 500 mM Cu^{2+}) byl patrný výrazný nárůst akumulace mědi ve stoncích a zejména pak také výrazný pokles množství mědi po 14 dnech kultivace. V listech nedocházelo při koncentraci 50 mM Cu^{2+} a 250 mM Cu^{2+} k výrazné akumulaci mědi v porovnání s kontrolou. V případě koncentrace 500 mM Cu^{2+} došlo k nárůstu množství mědi po třech dnech a dále zůstalo přibližně konstantní (cca 0,25 mg/g sušiny).

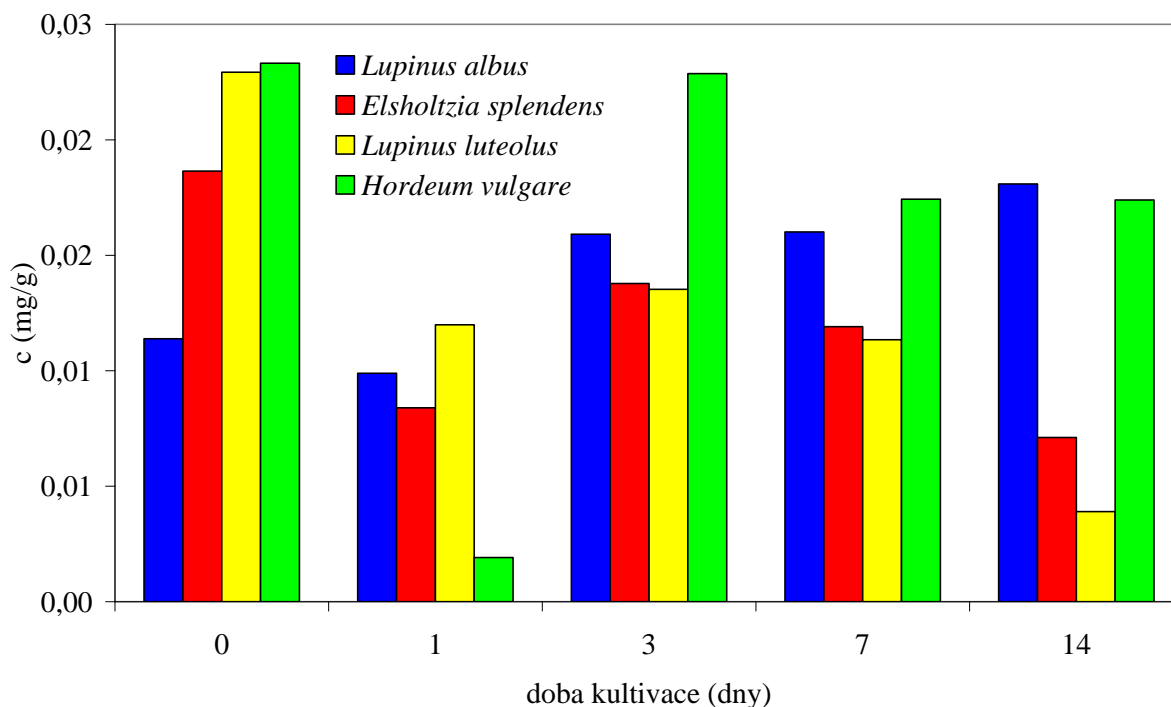
graf 1 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přidavku měďnatých iontů



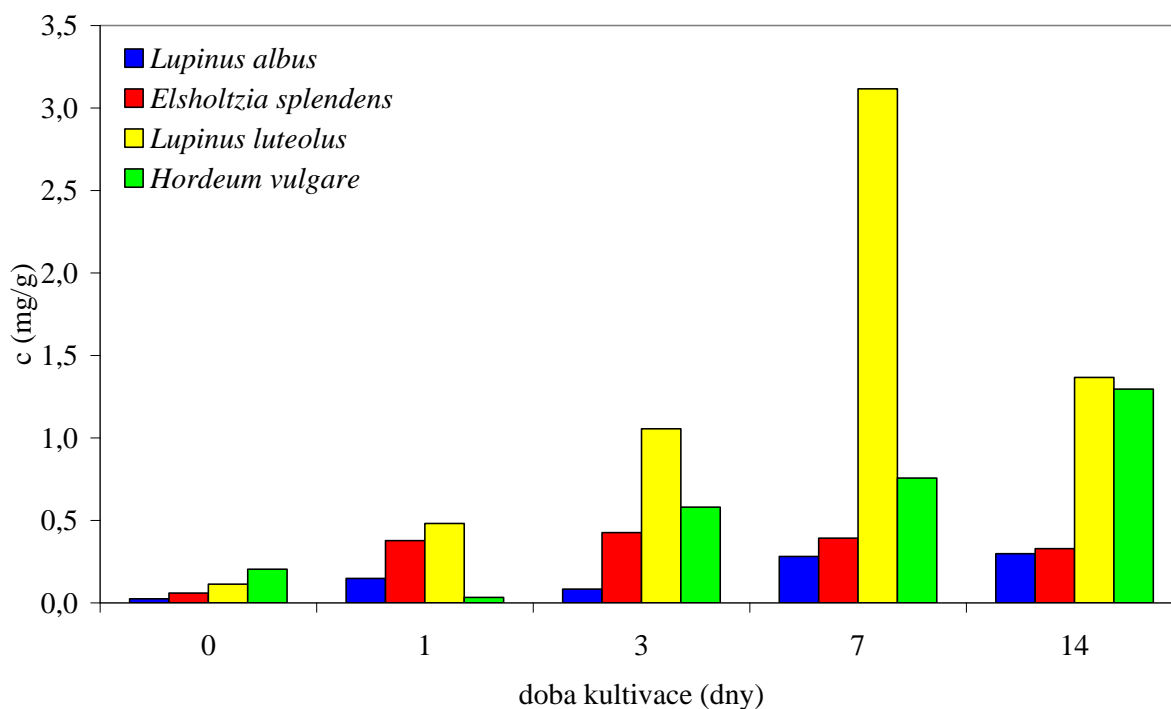
graf 2 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přidavku měďnatých iontů



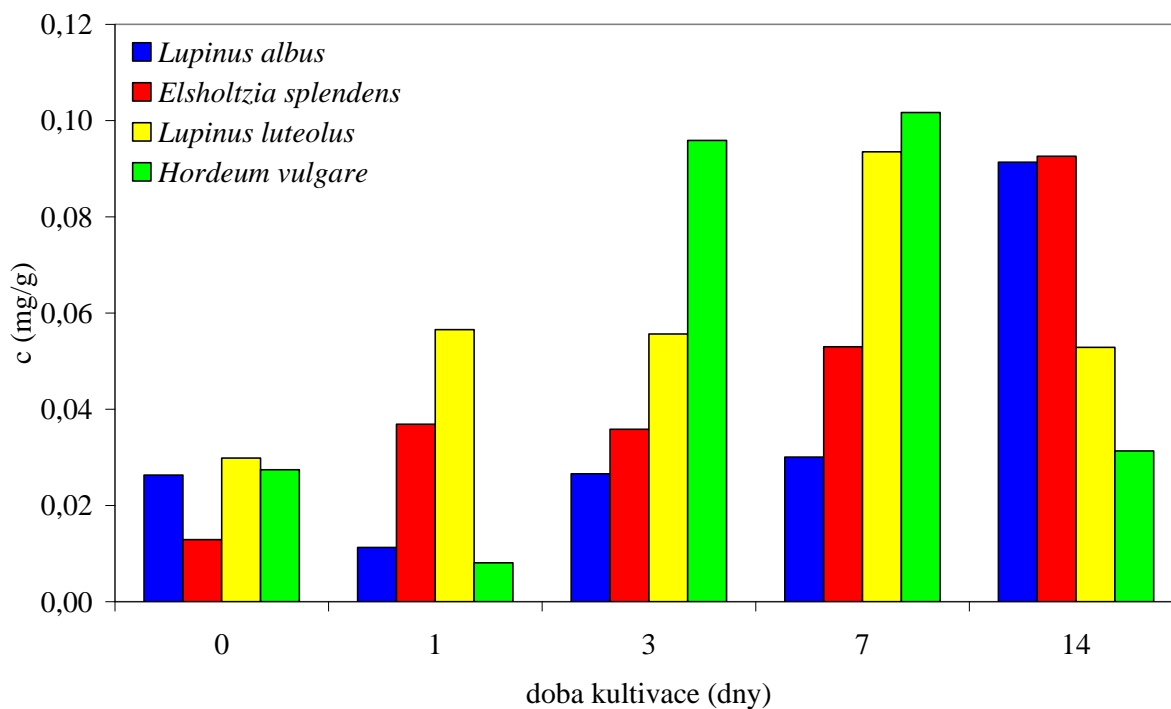
graf 3 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přidavku měďnatých iontů



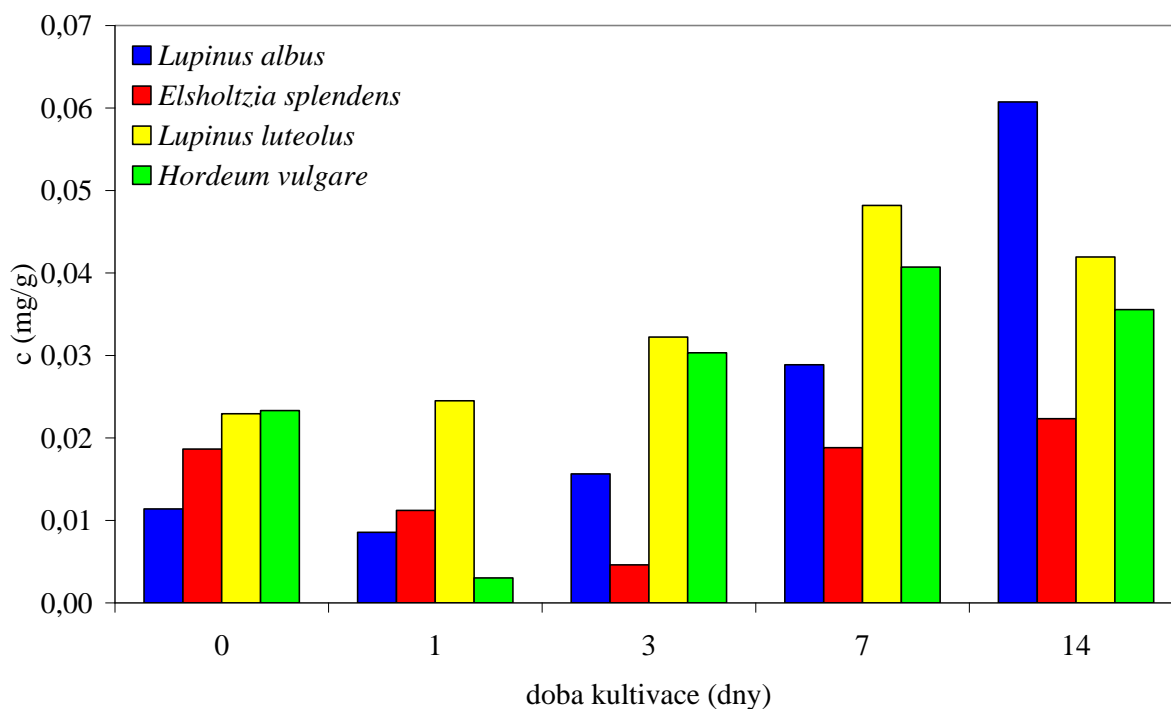
graf 4 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 50 mmol/l



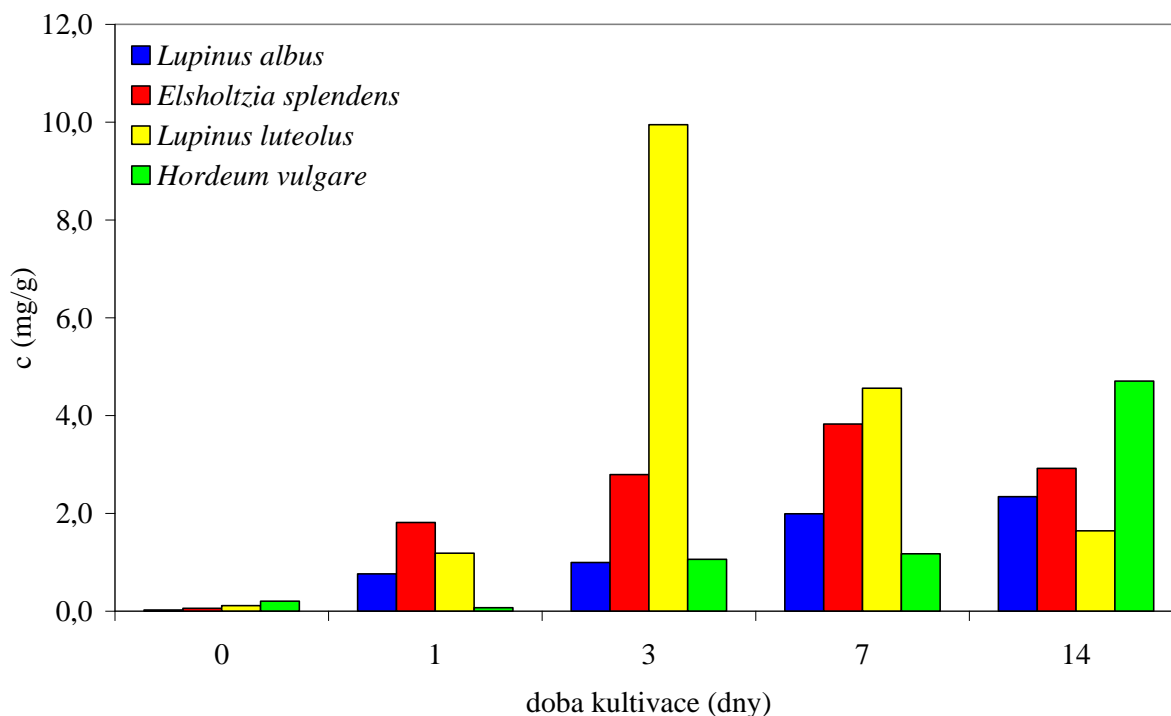
graf 5 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 50 mmol/l



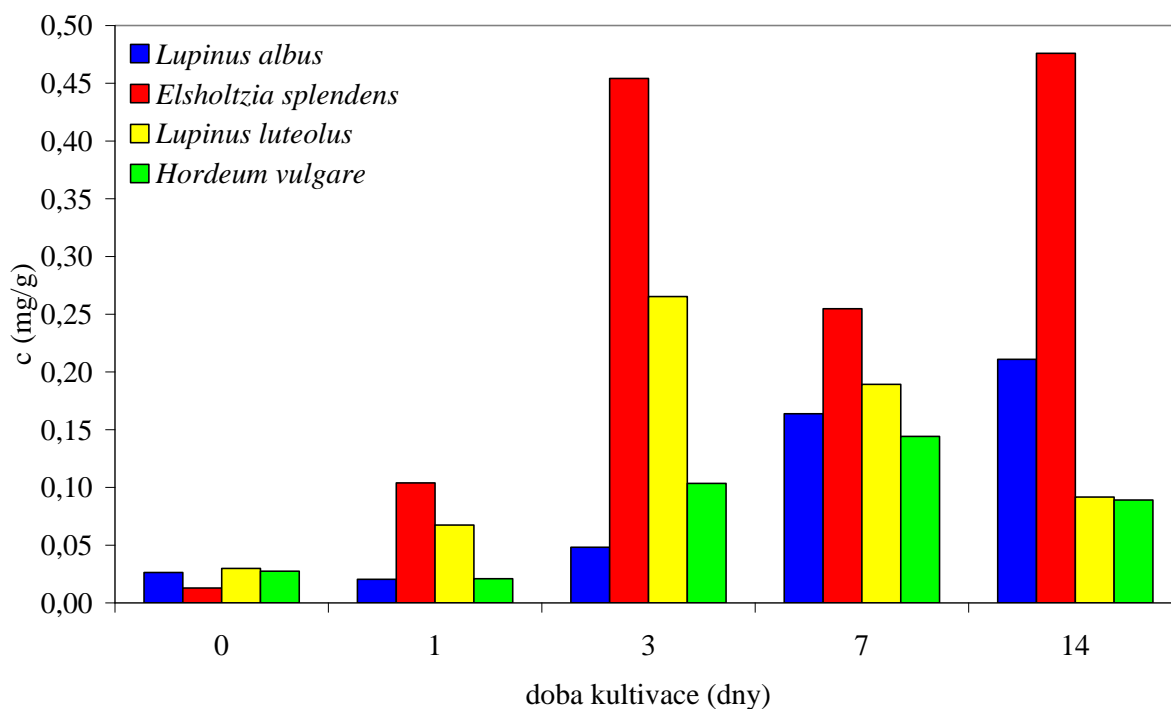
graf 6 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 50 mmol/l



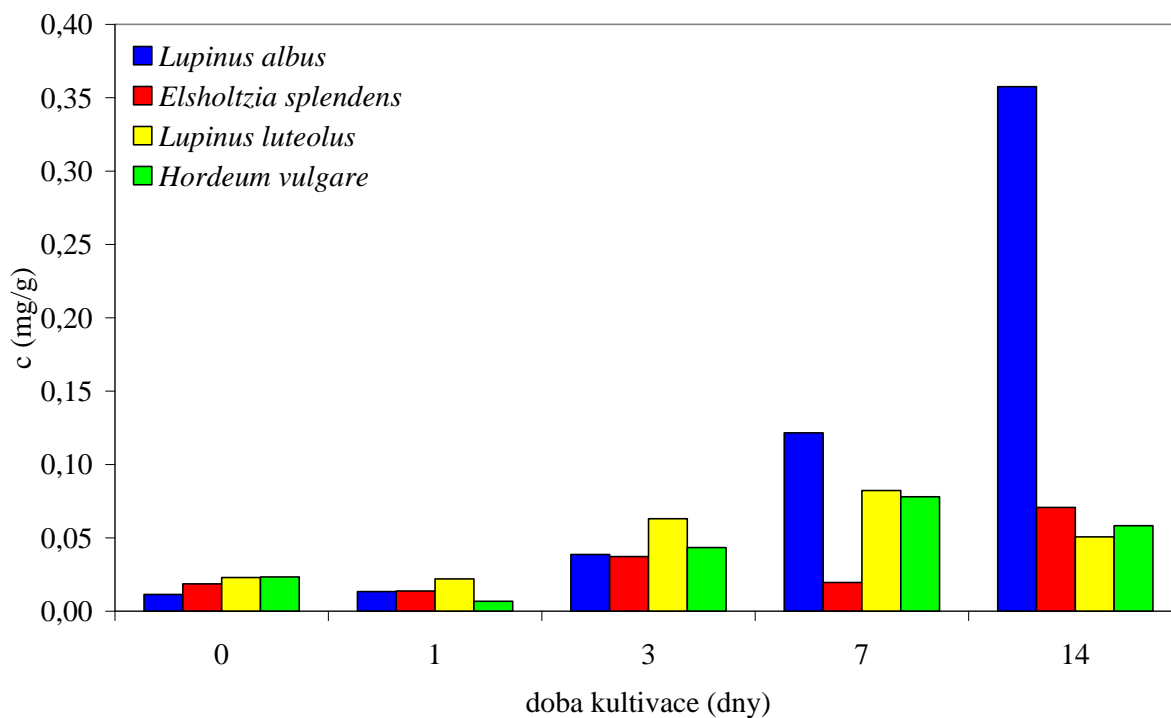
graf 7 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 250 mmol/l



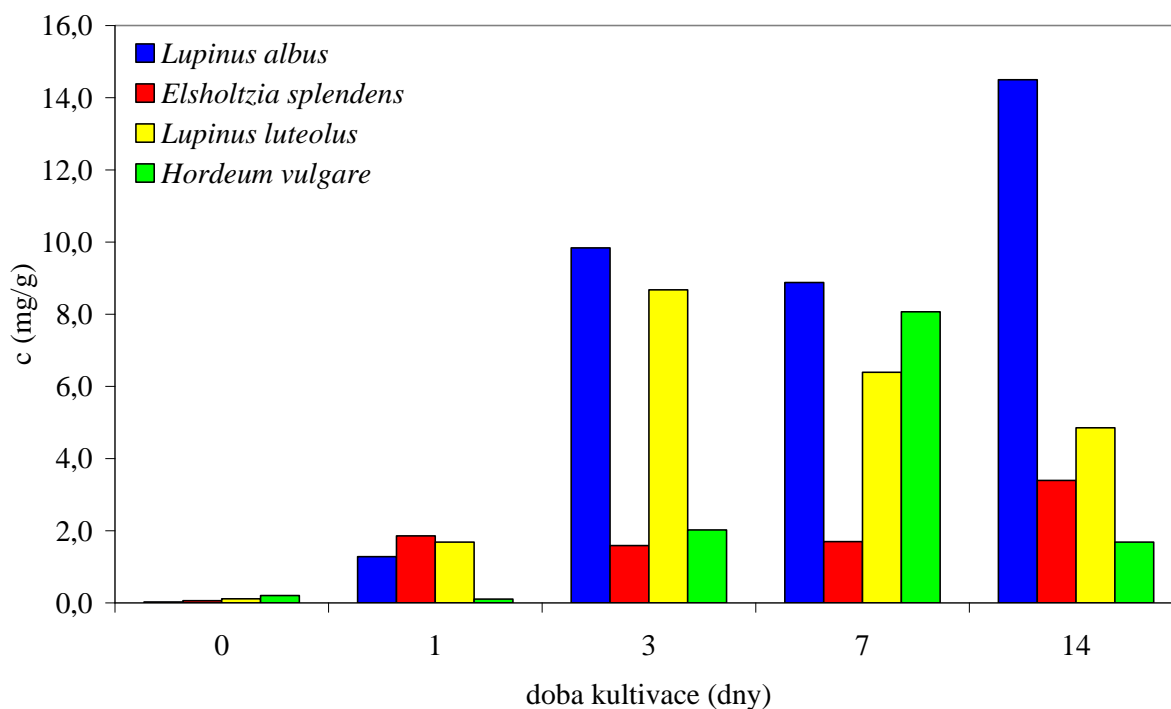
graf 8 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 250 mmol/l



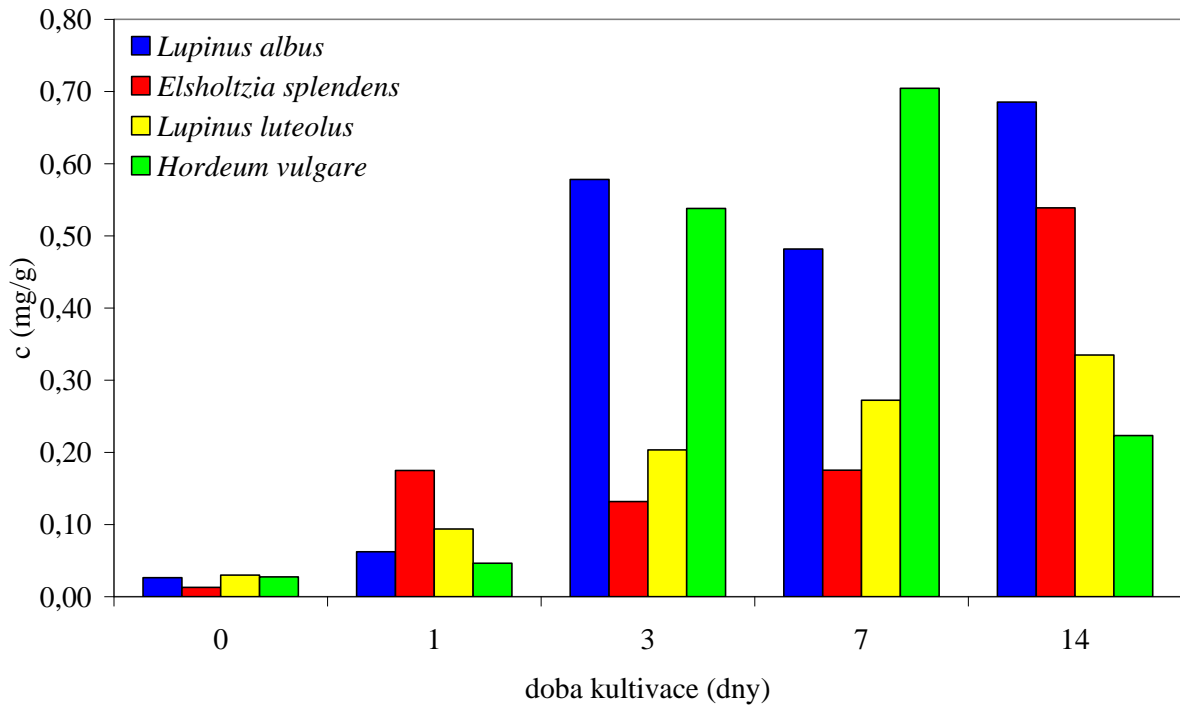
graf 9 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 250 mmol/l



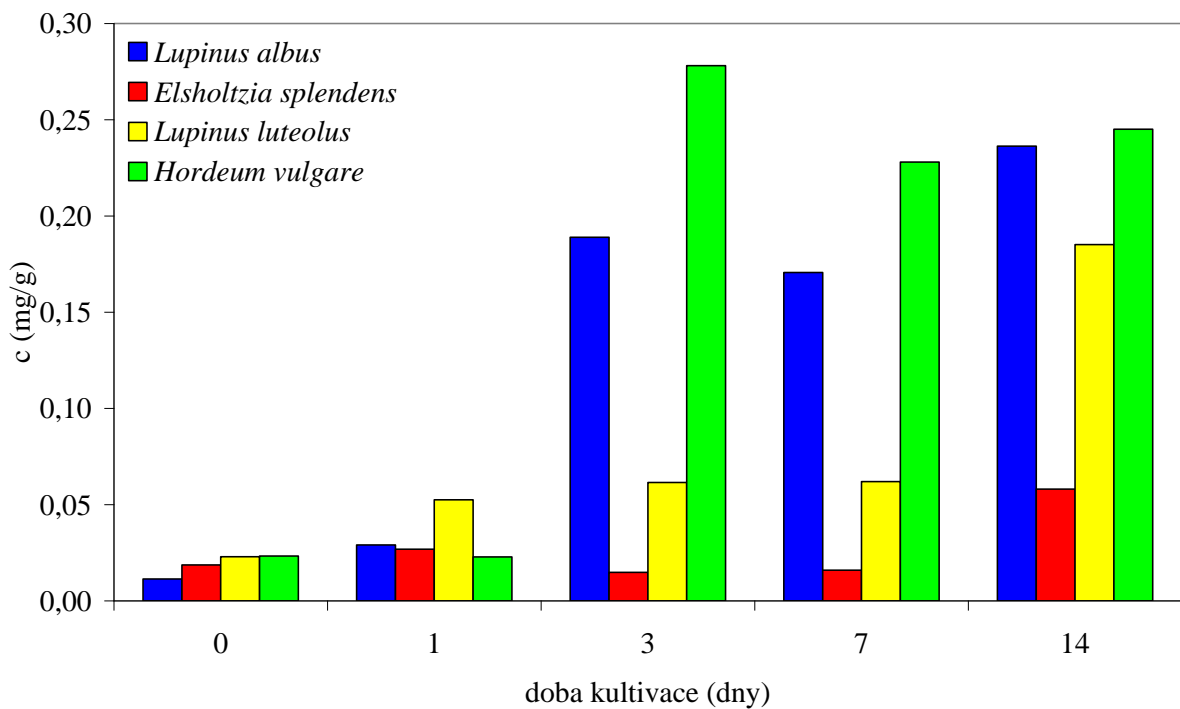
graf 10 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 500 mmol/l



graf 11 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 500 mmol/l



graf 12 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Lupinus albus*, *Elsholtzia splendens*, *Lupinus luteolus* a *Hordeum vulgare* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 500 mmol/l



4.1.5. *Allium sativum*

Množství mědi v kořenech česneku bylo relativně velmi nízké a bylo závislé na výchozí koncentraci měďnatých iontů v médiu. Akumulace mědi je při všech testovaných koncentracích velmi pozvolná. Nejvyšší množství bylo nalezeno v kořenech po 14 denní kultivaci v médiu s 500 mM Cu^{2+} (cca 2 mg/g sušiny). Ve stoncích bylo nalezeno signifikantně vyšší množství mědi pouze u rostlin kultivovaných v médiu s 250 mM Cu^{2+} a 500 mM Cu^{2+} , a to mezi 0,1 až 0,2 mg/g sušiny, přičemž lze pozorovat nárůst množství mědi se vzrůstajícím časem kultivace. Transport do listové části je signifikantně neprůkazný a hodnoty obsahu mědi se pohybují mírně nad množstvím stanoveným v kontrolních rostlinách.

4.1.6. *Cucumis sativa*

Rostliny kultivované v médiu s přidavkem 250 mM Cu^{2+} nebo 500 mM Cu^{2+} obsahovaly v kořenech významně zvýšené množství mědi. Nejvíce mědi bylo akumulováno již po 3 dnech (cca 15 mg/g sušiny při kultivaci s 500 mM Cu^{2+}), ale následně došlo ke snížení, protože kořenový systém a následně celá rostlina odumřela (při koncentraci 500 mM Cu^{2+} i 250 mM Cu^{2+}). Při koncentraci 50 mM Cu^{2+} nejsou hodnoty statisticky významně rozdílné v porovnání s kontrolními rostlinami. Ve stoncích lze pozorovat zvýšený obsah mědi v porovnání s kontrolou pouze v případě kultivace v médiu s 500 mM Cu^{2+} a i v tomto případě bylo zvýšení signifikantní pouze první a sedmý den. Transport z kořenů byl minimální a taktéž akumulace v listové část byla neprůkazná. Množství mědi stanovené v listech rostlin při všech testovaných koncentracích byla prakticky stejné jako v případě kontrolních rostlin.

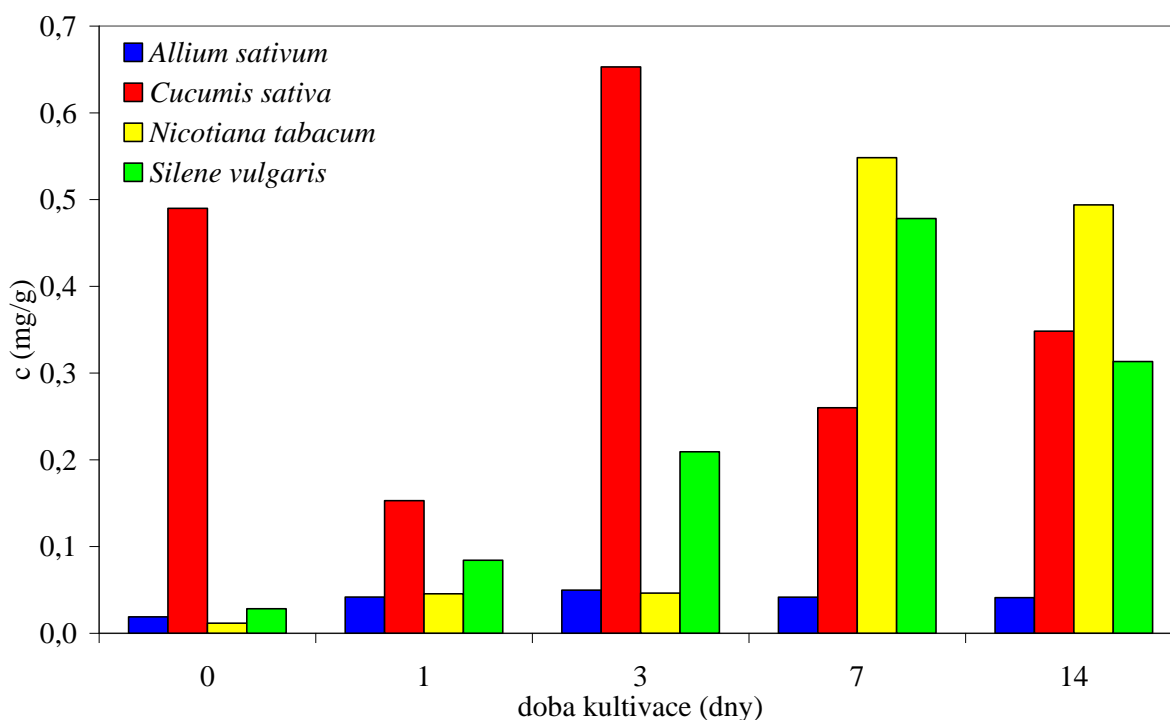
4.1.7. *Nicotiana tabacum*

V kořenech tabáku docházelo k nárůstu obsahu mědi v průběhu kultivačního intervalu a to i v případě kontrolních rostlin. Množství mědi rostlo také se zvyšující se koncentrací mědi v médiu. Nejvyšší množství mědi bylo stanoveno po 14 dnech v kořenech rostlin kultivovaných na médiu s 500 mM Cu^{2+} (cca 4 mg/g sušiny). Ve stoncích byla hladina mědi po počáteční akumulaci udržována na relativně konstantní úrovni okolo 0,1 mg/g sušiny. Kontrolní rostliny obsahovali mědi méně (cca 0,06 mg/g sušiny). Do listů měď prakticky transportována nebyla a její množství nebylo statisticky významně rozdílné v porovnání s kontrolními rostlinami.

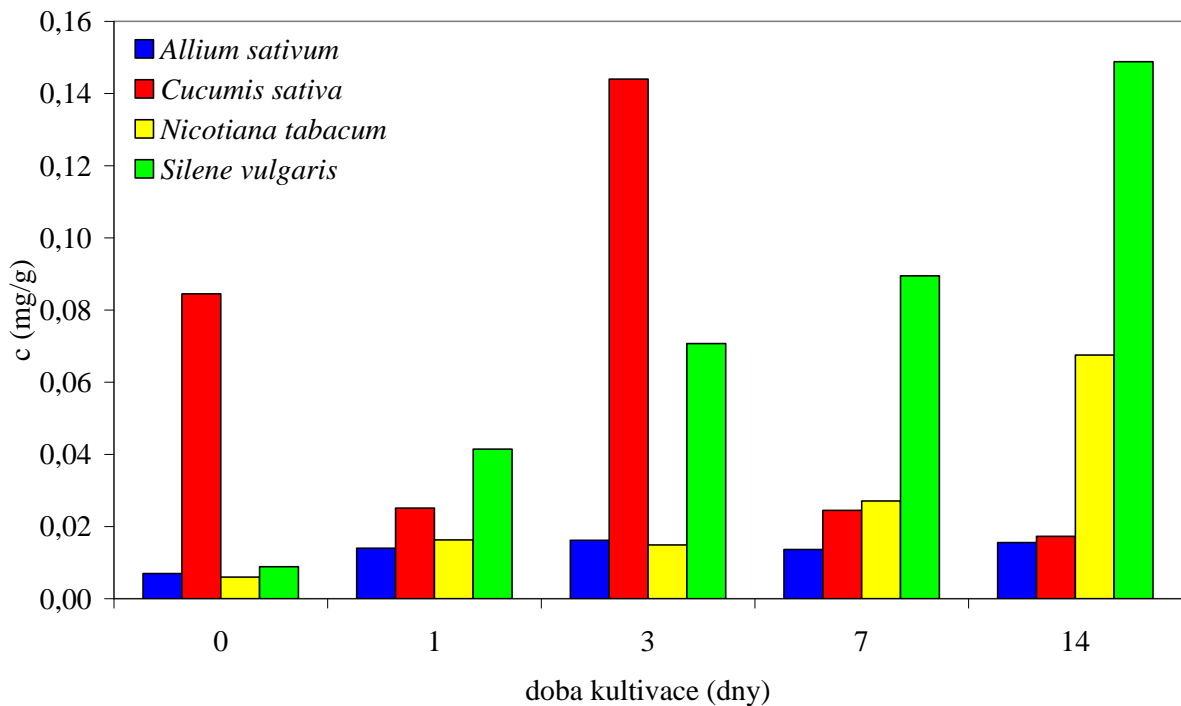
4.1.8. *Silene vulgaris*

Statisticky průkazné zvýšení obsahu mědi v kořenech silenky bylo pozorováno pouze u rostlin kultivovaných v médiu s 500 mM Cu^{2+} . Při nižších koncentracích se množství ani průběh akumulace mědi nelišil od kontrolních rostlin. Nejvyšší množství mědi bylo stanoveno po 14 dnech kultivace v médiu s 500 mM Cu^{2+} (cca 2 mg/g sušiny). Statisticky významné rozdíly byly naopak zaznamenány v případě akumulace mědi ve stoncích. Se vzrůstající koncentrací mědi v médiu vzrostl její obsah ve stoncích. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny při koncentraci 500 mM Cu^{2+} po 7 a 14 dnech kultivace (0,9 – 1,0 mg/g sušiny). Významný je také transport do listové části rostliny, kde bylo detekováno nejvíce mědi po 7 dnech kultivace (cca 0,6 mg/g sušiny pro koncentrace 250 mM Cu^{2+} a 500 mM Cu^{2+}). Po 14 dnech se ale množství mědi výrazně snížilo při všech třech testovaných koncentracích.

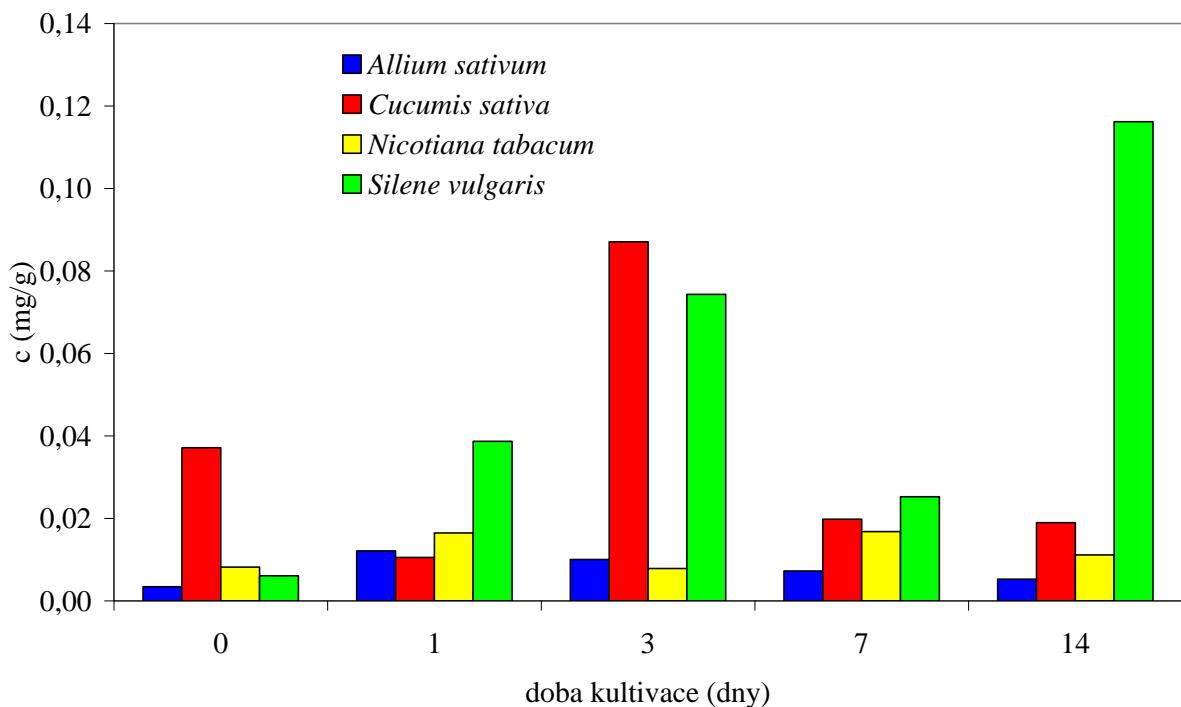
graf 13 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přídavku měďnatých iontů



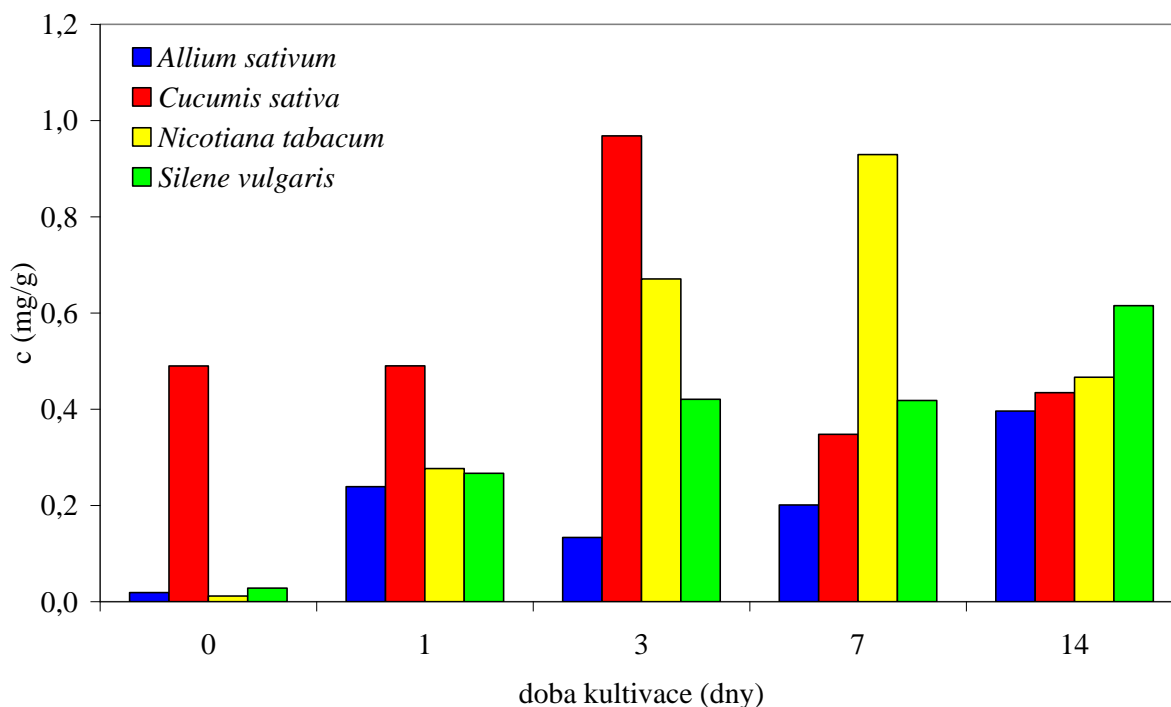
graf 14 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přidavku měďnatých iontů



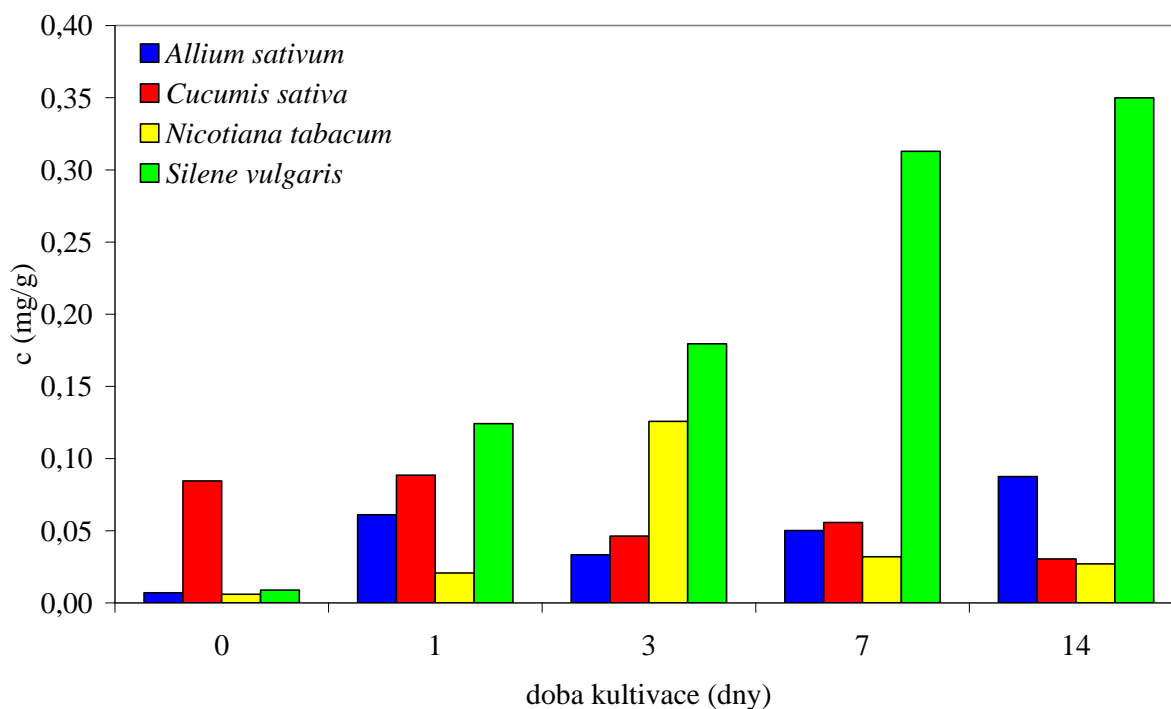
graf 15 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přidavku měďnatých iontů



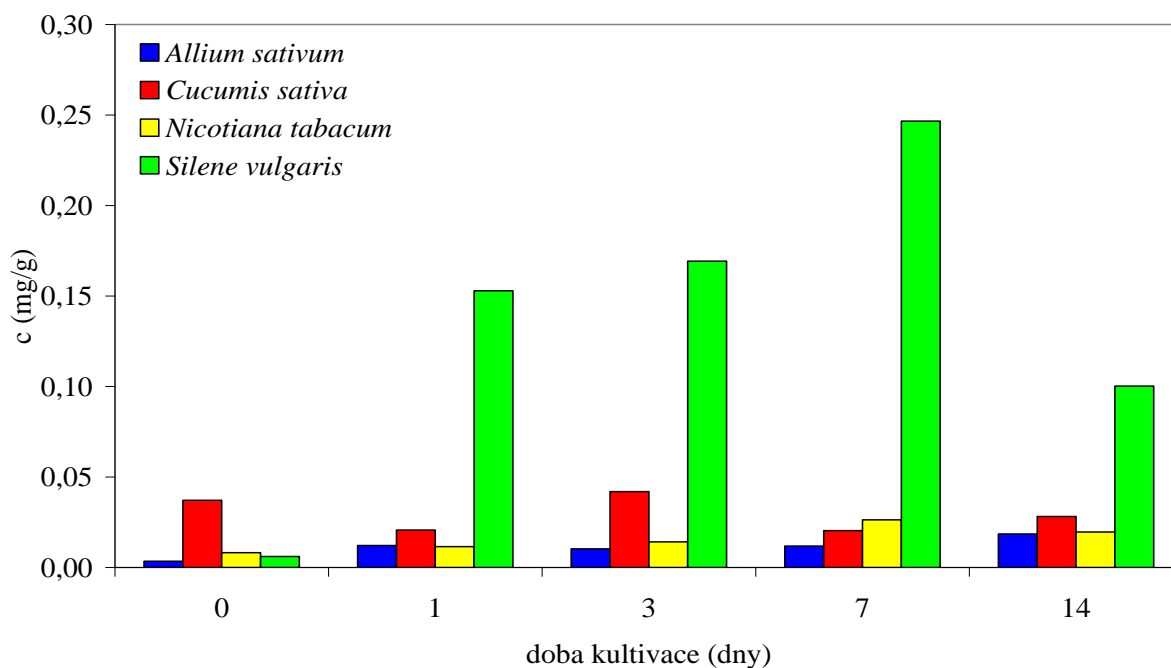
graf 16 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 50 mmol/l



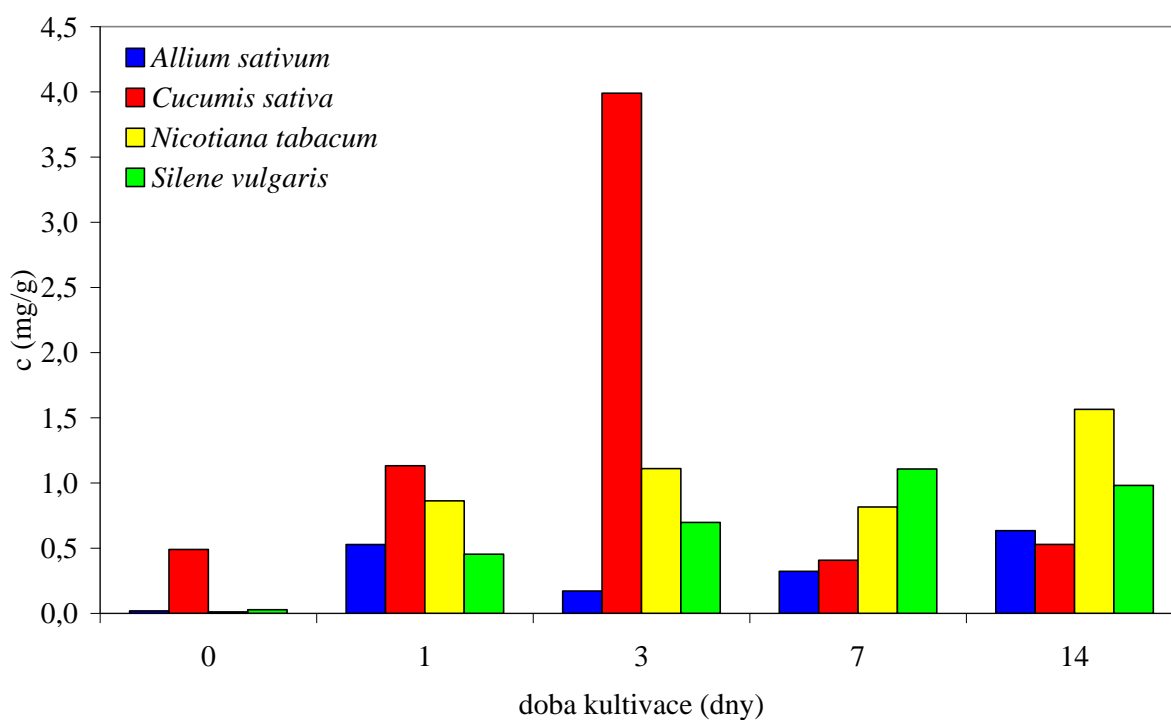
graf 17 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 50 mmol/l



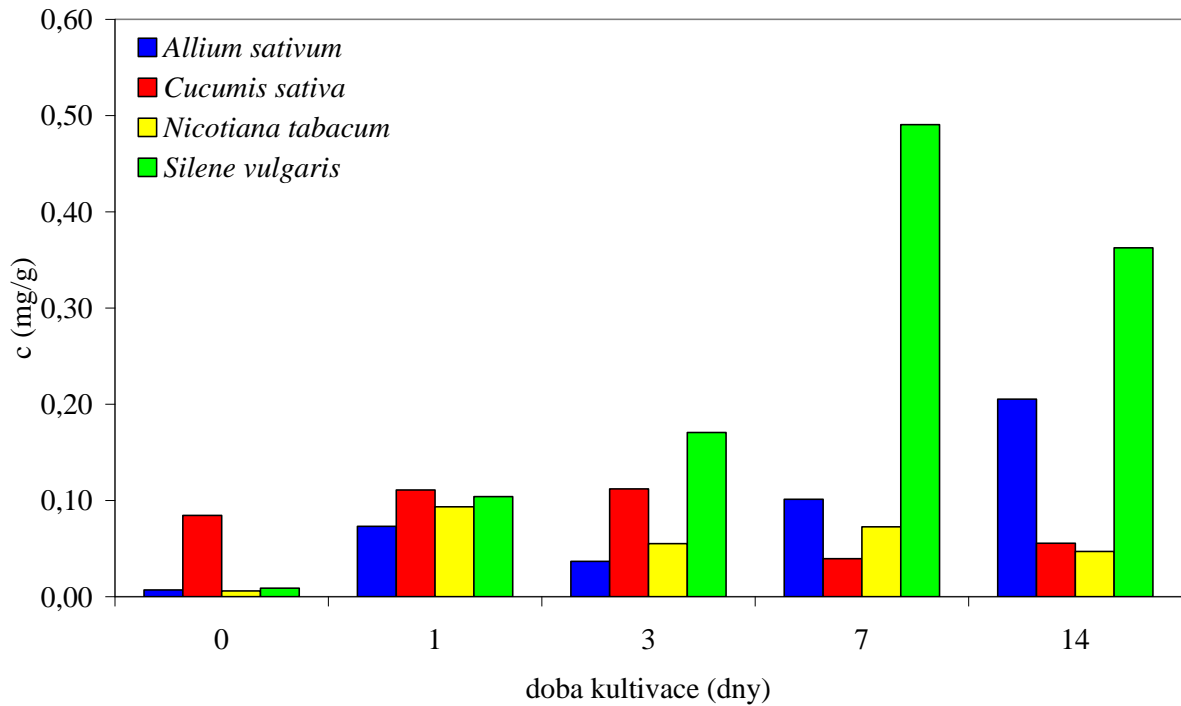
graf 18 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 50 mmol/l



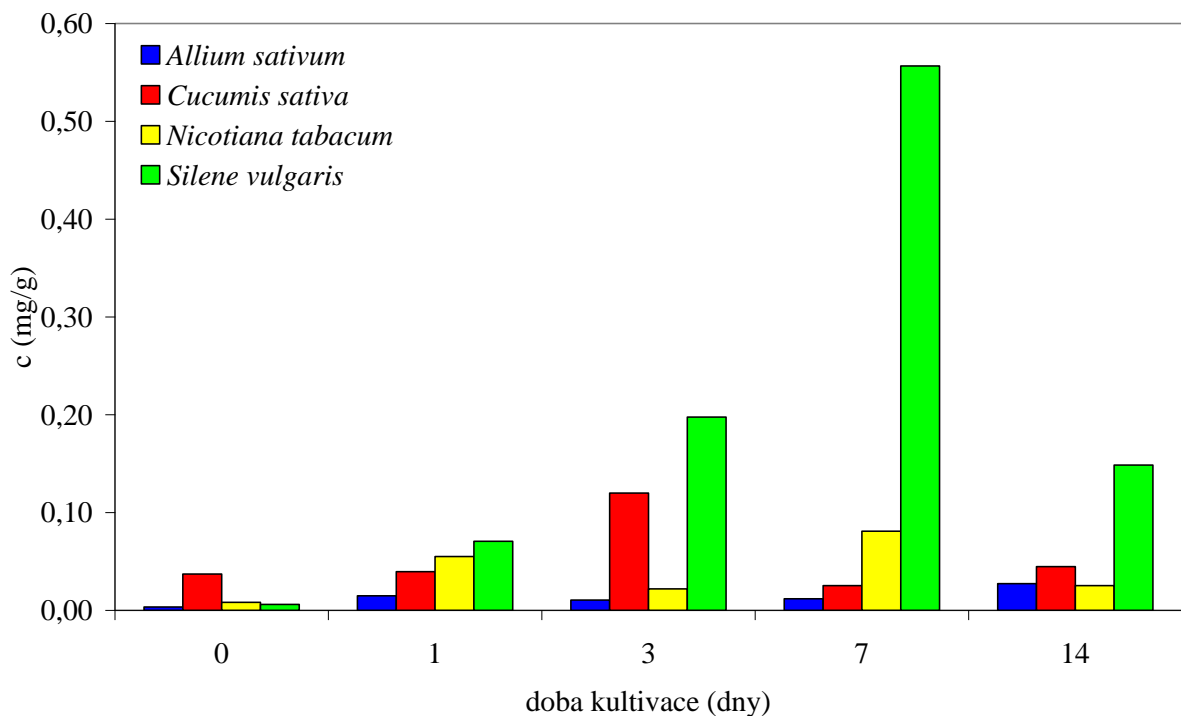
graf 19 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 250 mmol/l



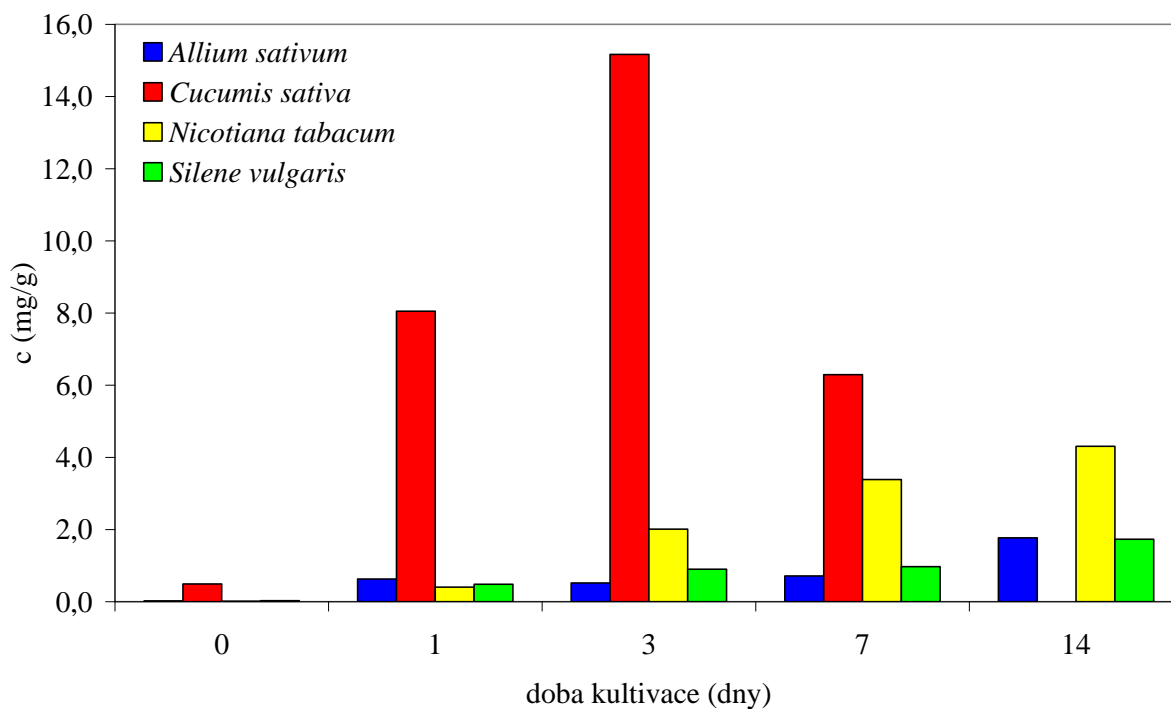
graf 20 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 250 mmol/l



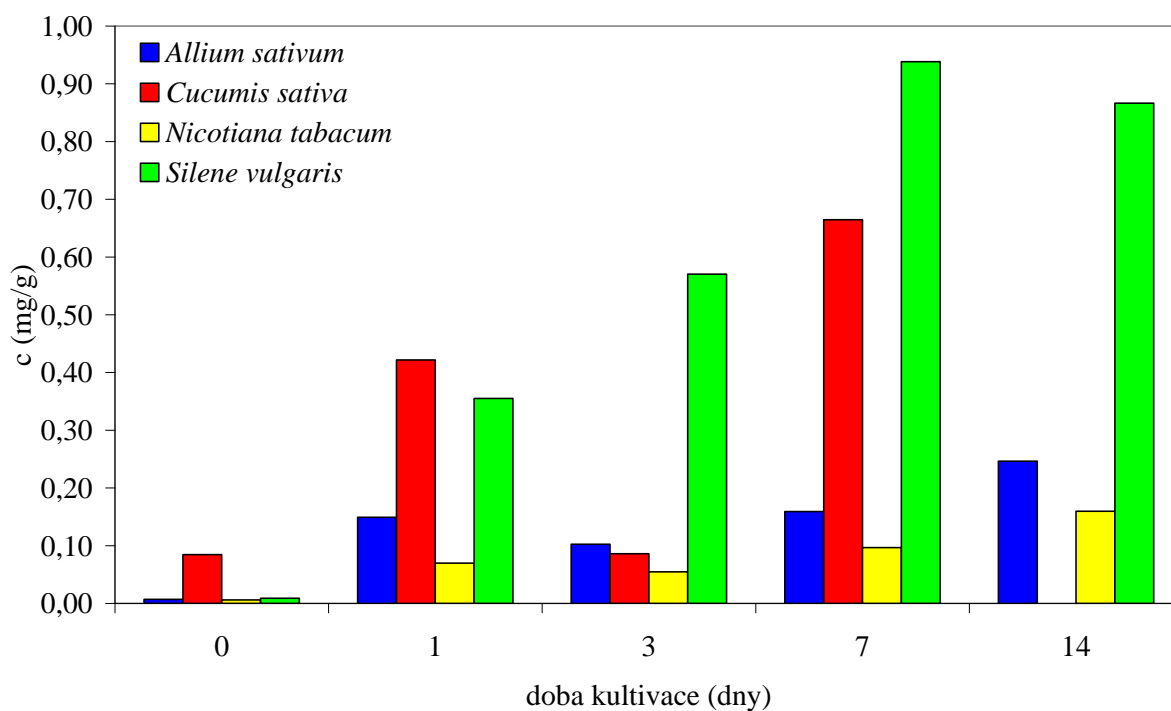
graf 21 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 250 mmol/l



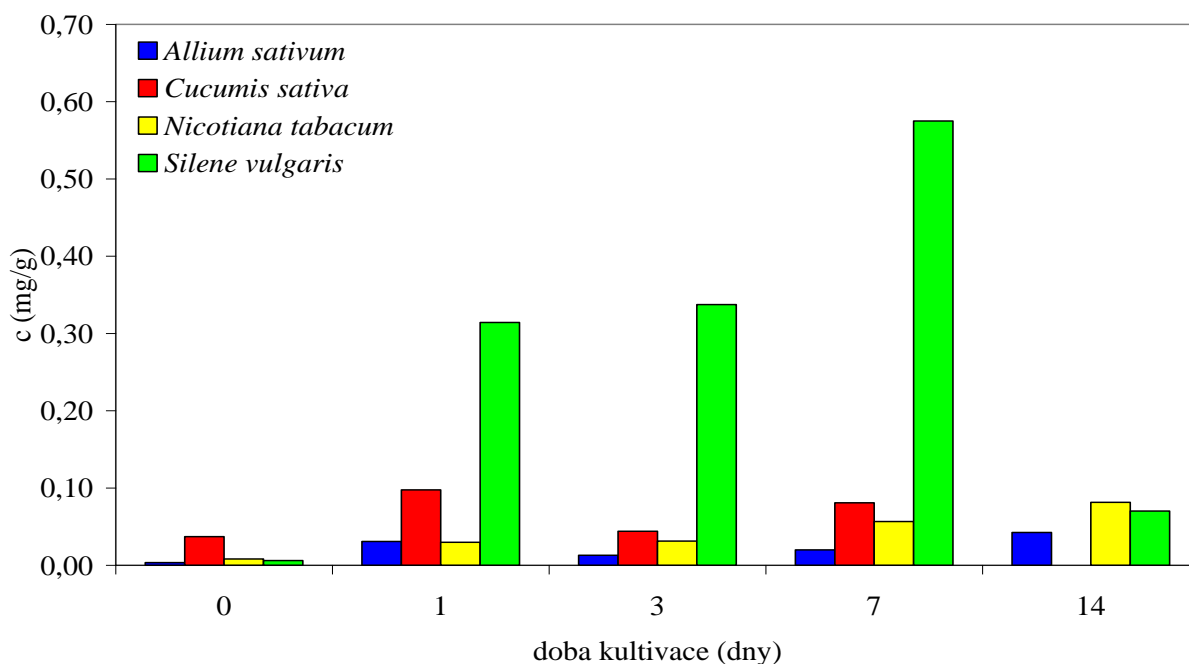
graf 22 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v kořenech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 500 mmol/l



graf 23 : Obsah mědi (mg/g sušiny) ve stoncích rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 500 mmol/l



graf 24 : Obsah mědi (mg/g sušiny) v listech rostlin *Allium sativum*, *Cucumis sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Silene vulgaris* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidávkem měďnatých iontů 500 mmol/l



4.2. Stresové odpovědi rostlin na přítomnost měďnatých iontů

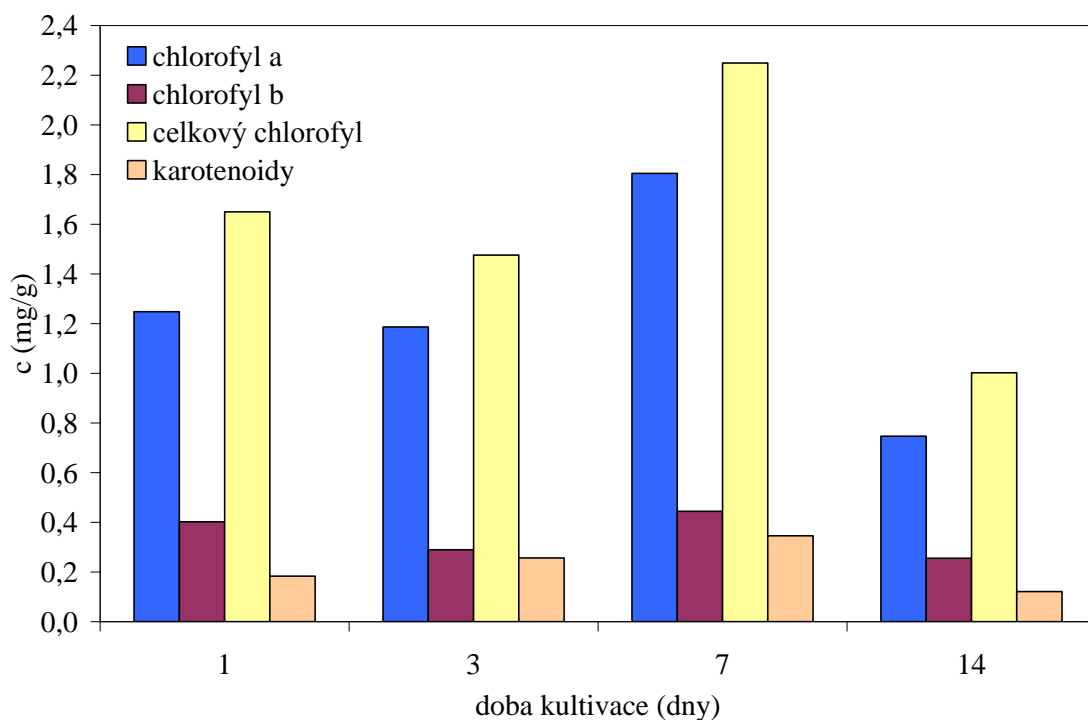
Hydroponické kultury rostlin *Elsholtzia splendens* a *Allium sativum* byly kultivovány v hydroponickém médiu s přidávkem soli mědi o koncentracích 50, 250 a 500 mM. Po 1, 3, 7 a 14 dnech kultivace byl odebrán vzorek vrcholových listů každé varianty na analýzy.

4.2.1. Obsah fotosyntetických pigmentů

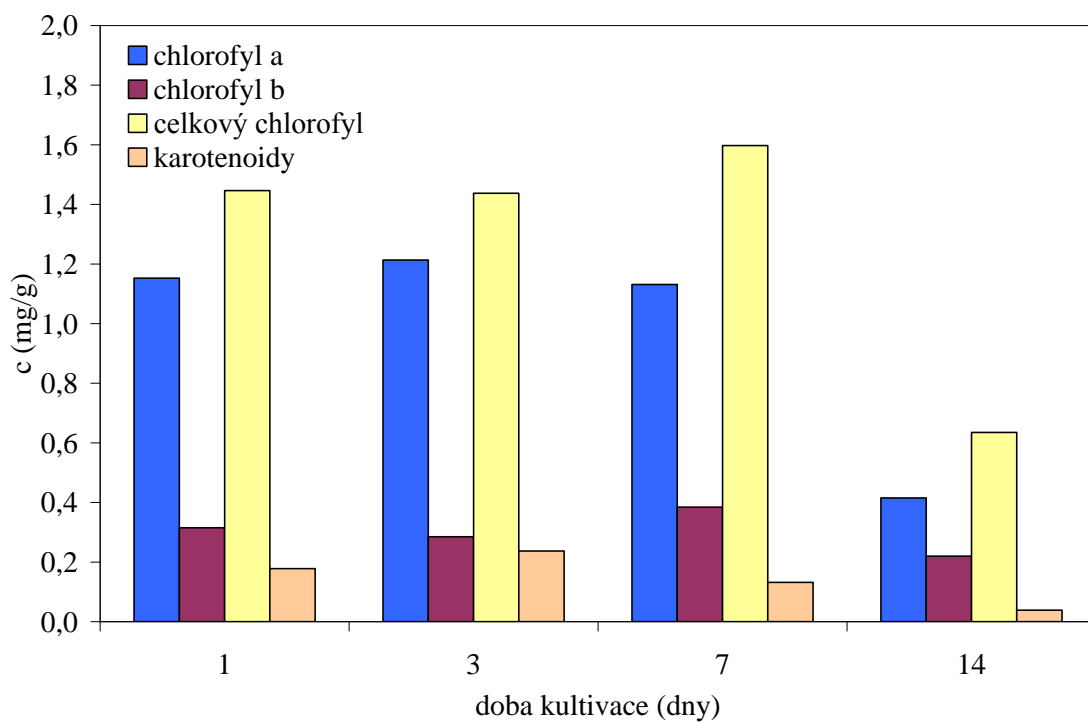
Byl zjištěn výrazný úbytek chlorofylu **a** a karotenoidů v případě *Elsholtzia splendens* kultivované v médiu s měďnatými kationty při všech testovaných koncentracích. V případě kontrolních rostlin bylo po 14 dnech snížení chlorofylu **a** také patrné. V kontrolních rostlinách a rostlinách kultivovaných v médiu s 50 mM Cu^{2+} a 250 mM Cu^{2+} došlo k počátečnímu nárůstu chlorofylu **a** (1 až 7 den) a následně k jeho poklesu. V případě koncentrace 500 mM Cu^{2+} byl pozorován od počátku kultivace úbytek chlorofylu **a**. Obsah chlorofylu **b** se statisticky významně neměnil v průběhu kultivace ani s koncentrací mědi v kultivačním roztoku. Ke snížení obsahu karotenoidů došlo až po 7 dnech.

V případě česneku nebyla pozorována žádná statisticky průkazná změna v obsahu chlorofylu **b** a karotenoidů. Obsah chlorofylu **a** v kontrolních rostlinách se snížil po 14 dnech kultivace. V případě rostlin kultivovaných v médiu s různými koncentracemi měďnatých iontů docházelo ke kolísání obsahu chlorofylu **a**, ale nebyl pozorován výrazný trend změny.

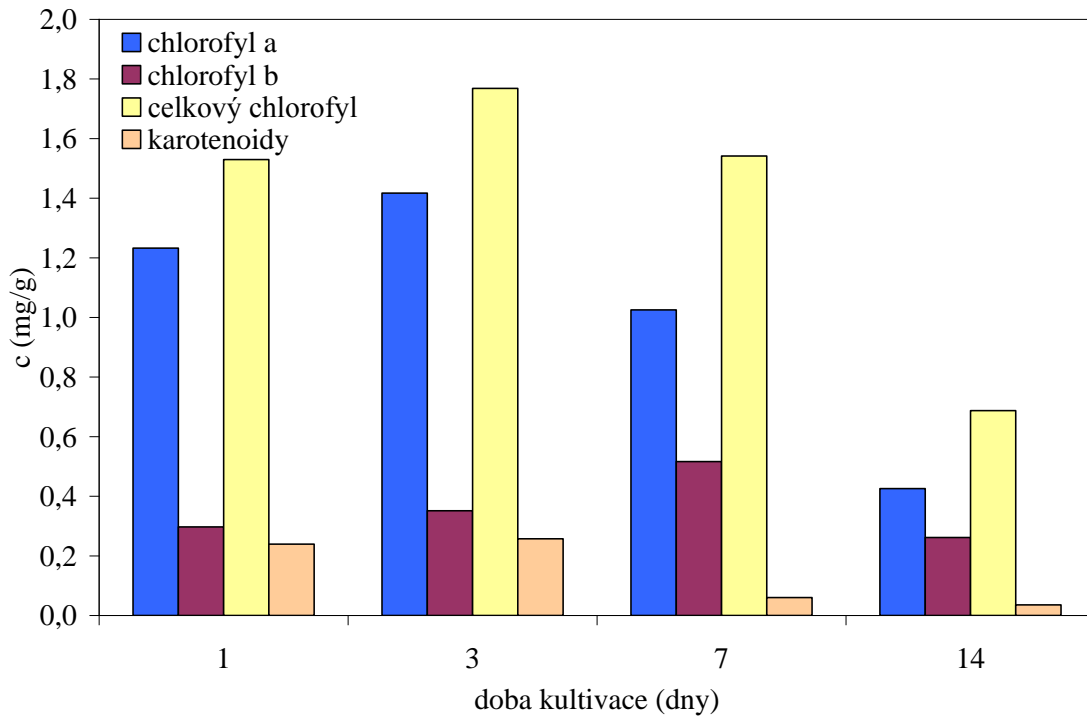
graf 25 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přidavku měďnatých iontů



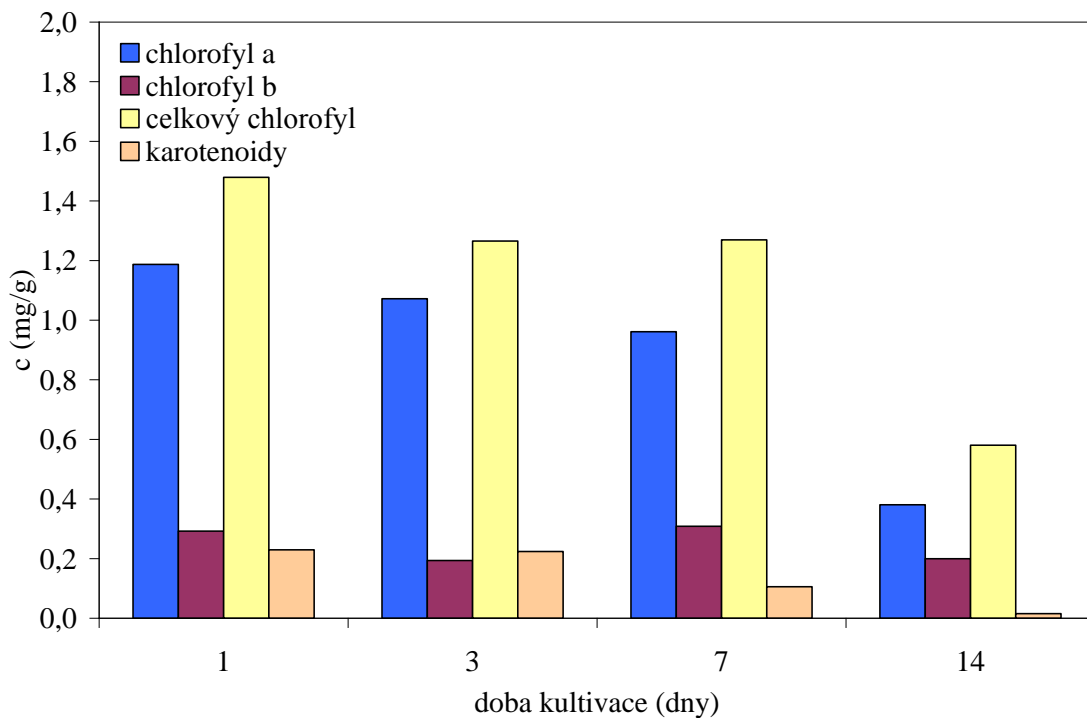
graf 26 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 50 mmol/l



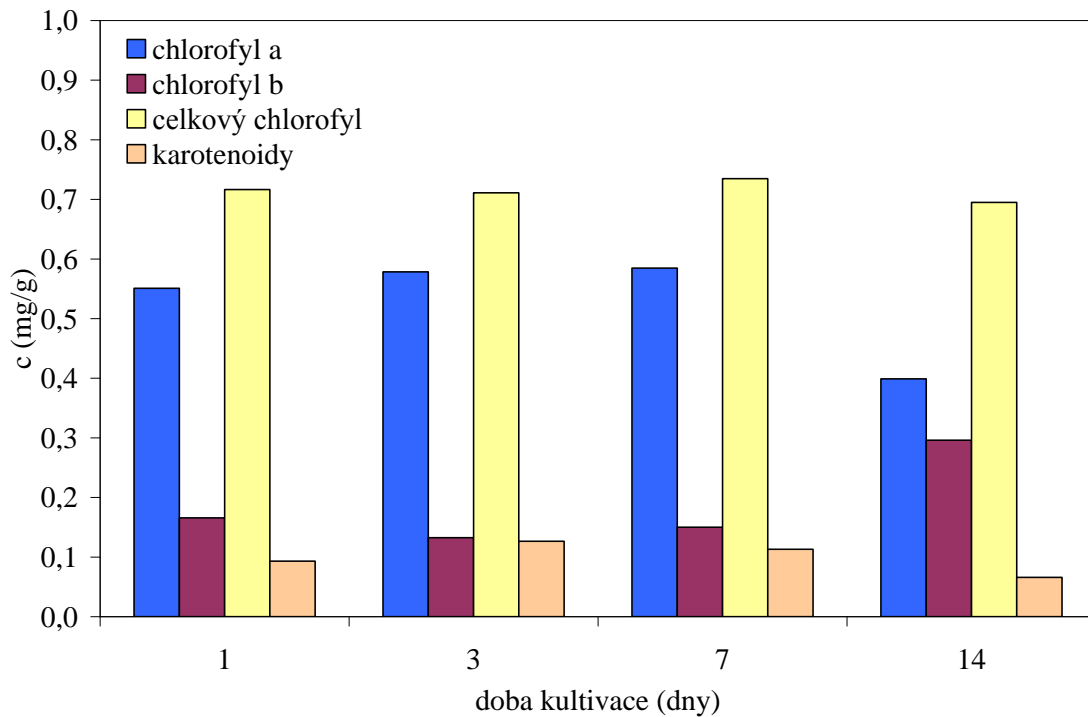
graf 27 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 250 mmol/l



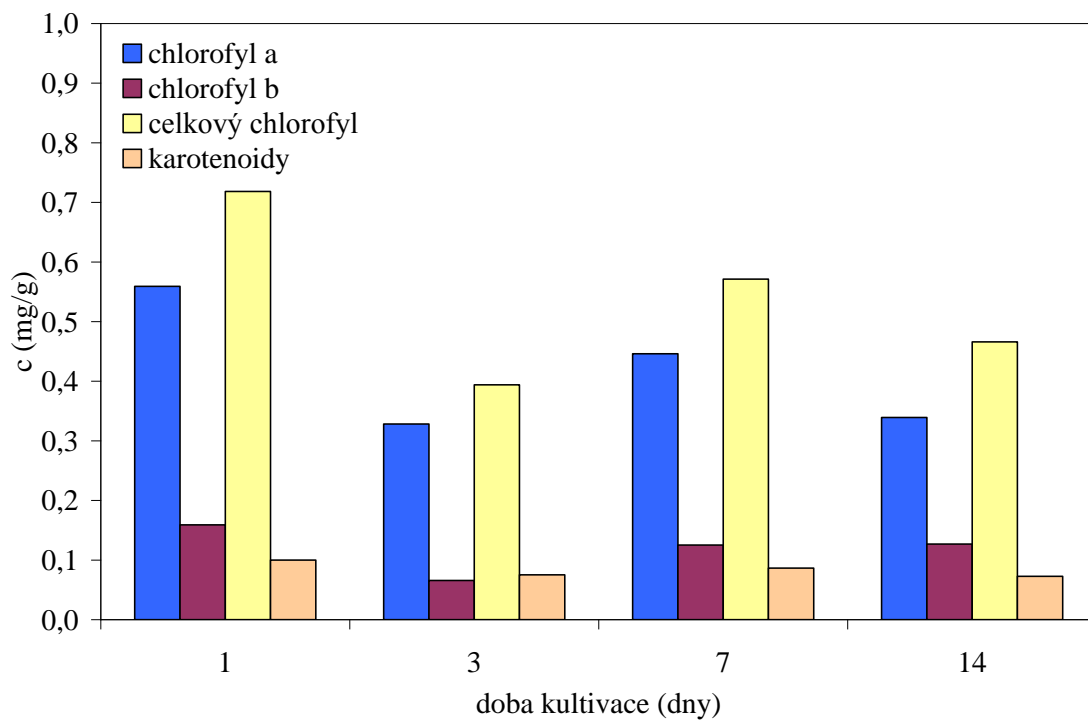
graf 28 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 500 mmol/l



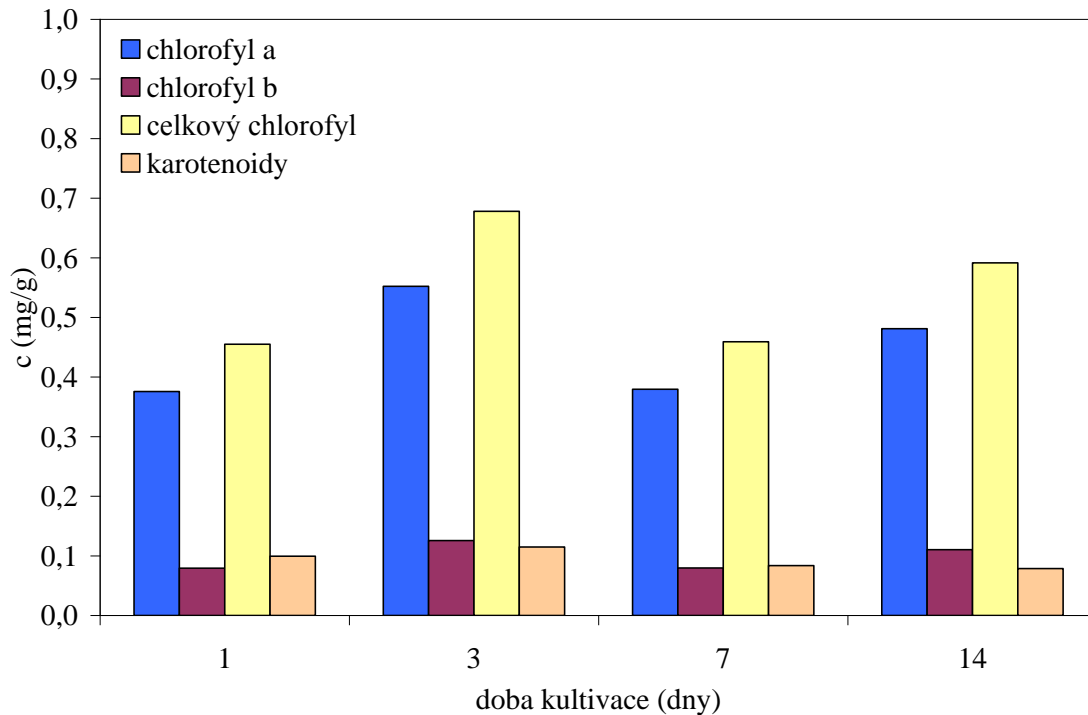
graf 29 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Allium sativum* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu bez přidavku měďnatých iontů



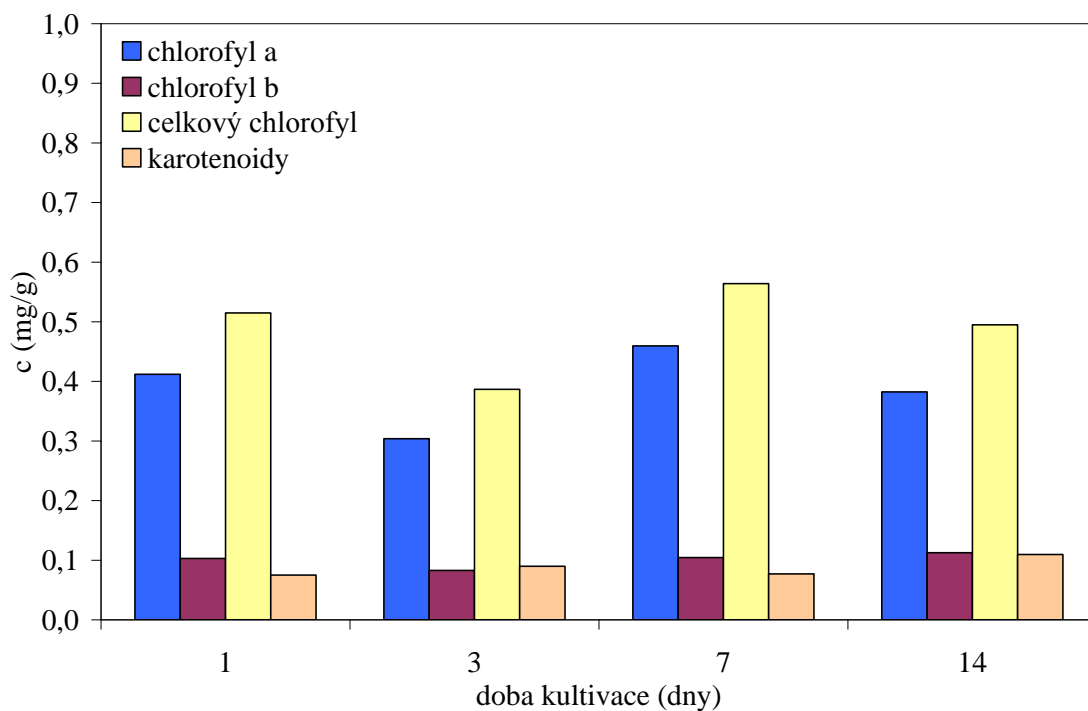
graf 30 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 50 mmol/l



graf 31 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 250 mmol/l



graf 32 : Obsah rostlinných barviv (mg/g čerstvé biomasy) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu s přidavkem měďnatých iontů 500 mmol/l

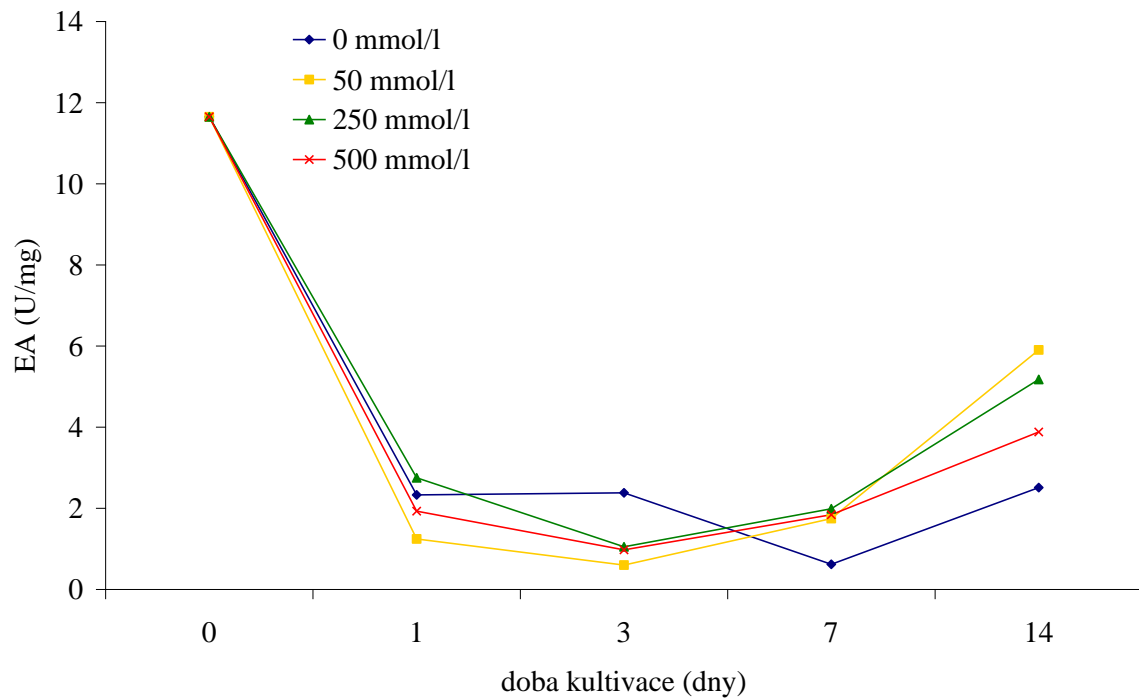


4.2.2. Stanovení peroxidásové aktivity

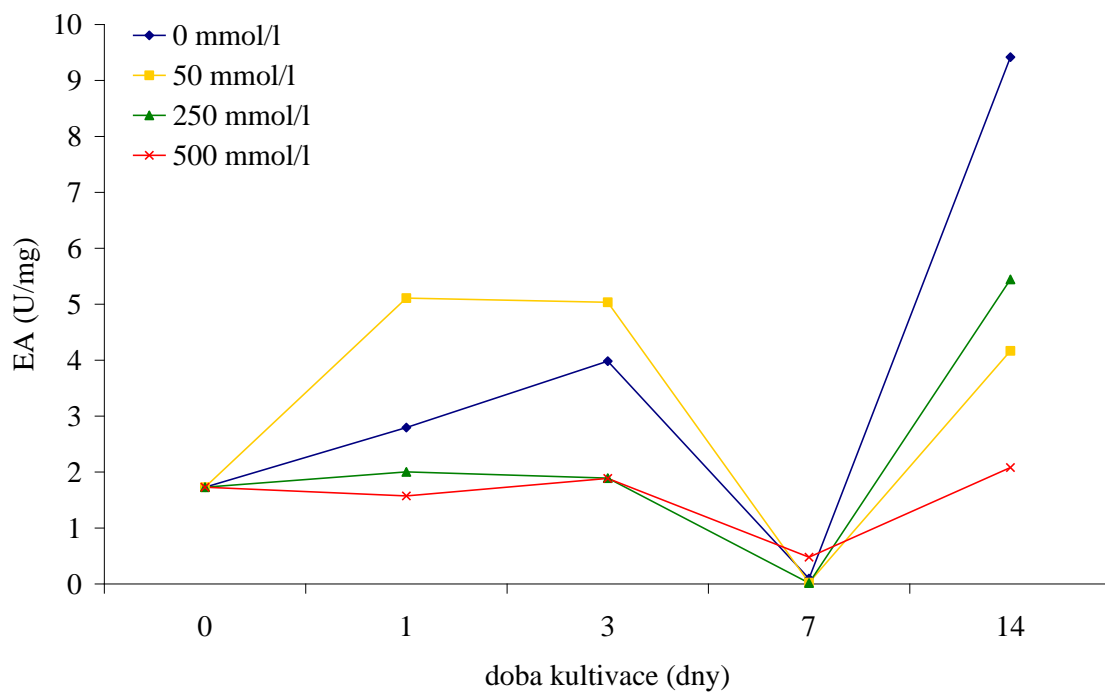
Aktivita peroxidasy byla měřena pomocí dvou substrátů (ABTS a guajakol). Rozdíly v hodnotách peroxidásové aktivity stanovené těmito dvěma substráty jsou stonásobné, časové závislosti jsou velmi podobné. V kořenech česneku došlo po zahájení experimentu k výraznému snížení peroxidásové aktivity, a to jak v kontrole, tak i u rostlin kultivovaných v médiu s přidávkem měďnatých iontů. Po 14 dnech aktivita peroxidasy mírně vzrostla, přičemž nejvyšší nárůst byl pozorován u rostlin rostoucích v médiu s 500 mM Cu^{2+} . Pro peroxidásovou aktivitu v listech byl zaznamenán podobný pokles, ale nedocházelo k nárůstu aktivity po 14 dnech. Aktivita ve stoncích vykazovala naopak stoupající trend, který byl přerušen 7 den výrazným poklesem. Nejvyšší hodnoty peroxidásové aktivity (substrát guajakol) byly tedy stanoveny na počátku experimentu v kořeni a listech (cca 12 U/mg respektive 19 U/mg proteinu) a dále ve stoncích kontrolních rostlin na konci experimentu po 14 dnech (cca 10 U/mg proteinu).

V kořenech *Elsholtzia splendens* (cca 44 U/mg proteinu) byla detekována třikrát vyšší peroxidásová aktivita než u česneku. Také zde byl pozorován výrazný pokles aktivity v průběhu kultivace. Aktivita v listech měla stoupající trend, přičemž nejvyšší byla zaznamenána v rostlinách kultivovaných v médiu s koncentrací 500 mM Cu^{2+} (cca 38 U/mg proteinu). Ostatní rostliny (kontrolní a v médiu s 50 mM a 250 mM) nevykazovaly tak výrazně stoupající trend a množství peroxidasy se pohybovalo okolo 2-4 U/mg proteinu. Peroxidasa ve stoncích měla stoupající charakter, její množství ale bylo v porovnání s listy a kořeny poloviční a navíc v průběhu kultivace docházelo k výraznému kolísání jejího množství.

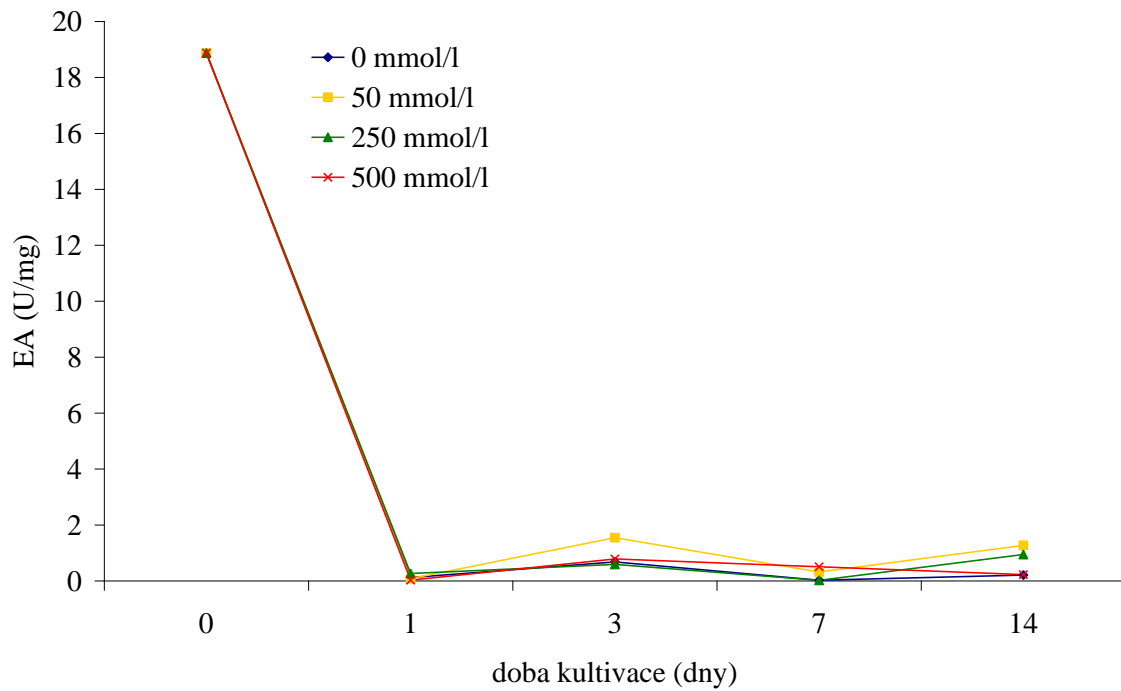
graf 33 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v kořenech rostliny *Allium sativum* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát guajakol



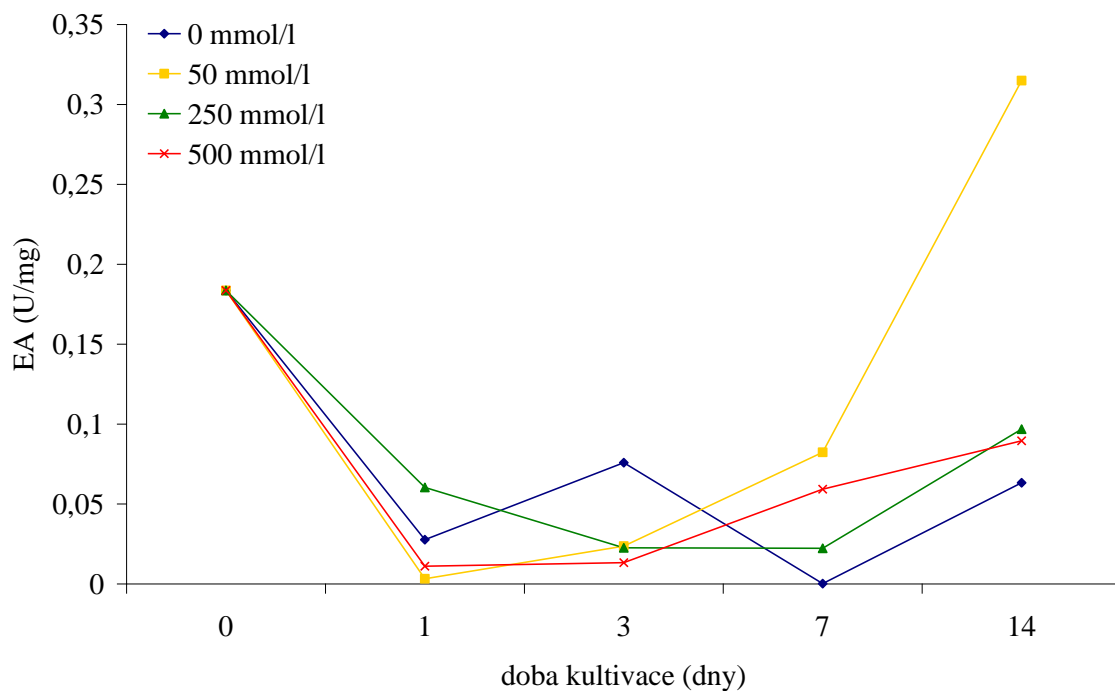
graf 34 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) ve stoncích rostliny *Allium sativum* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát guajakol



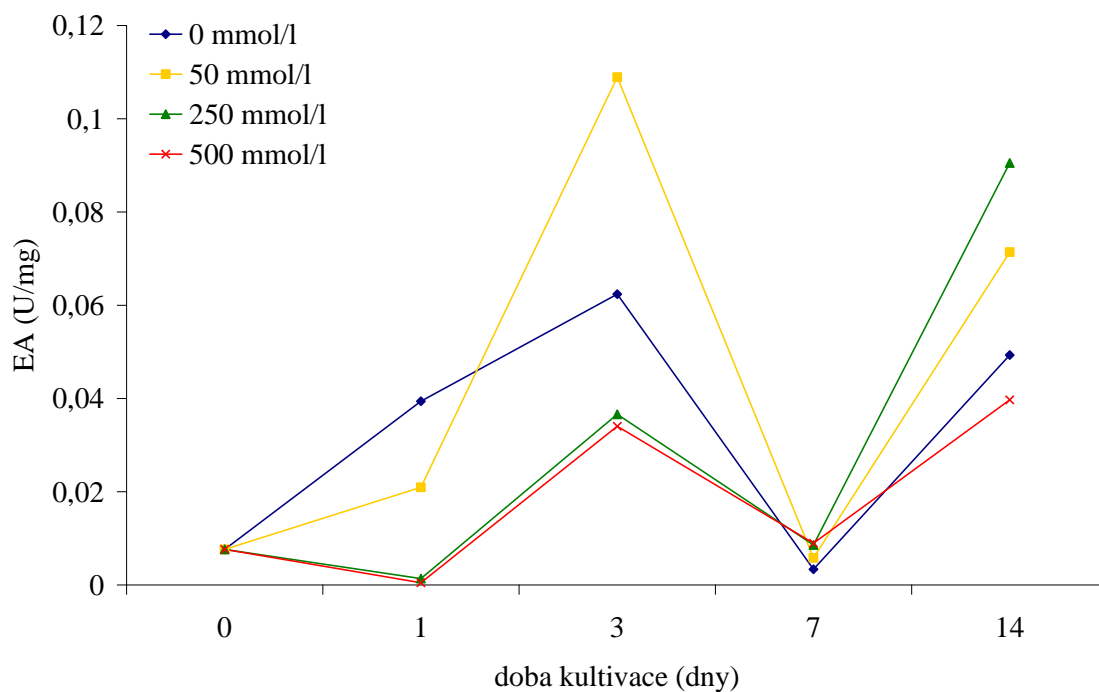
graf 35 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v listech rostliny *Allium sativum* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát guajakol



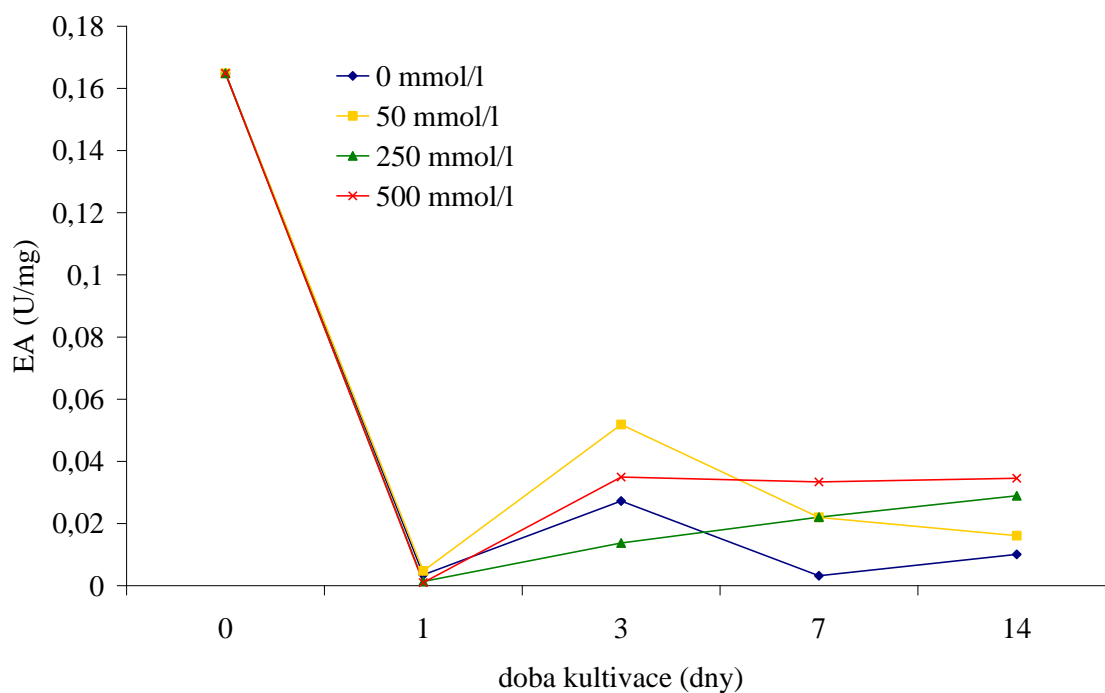
graf 36 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v kořenech rostliny *Allium sativum* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát ABTS



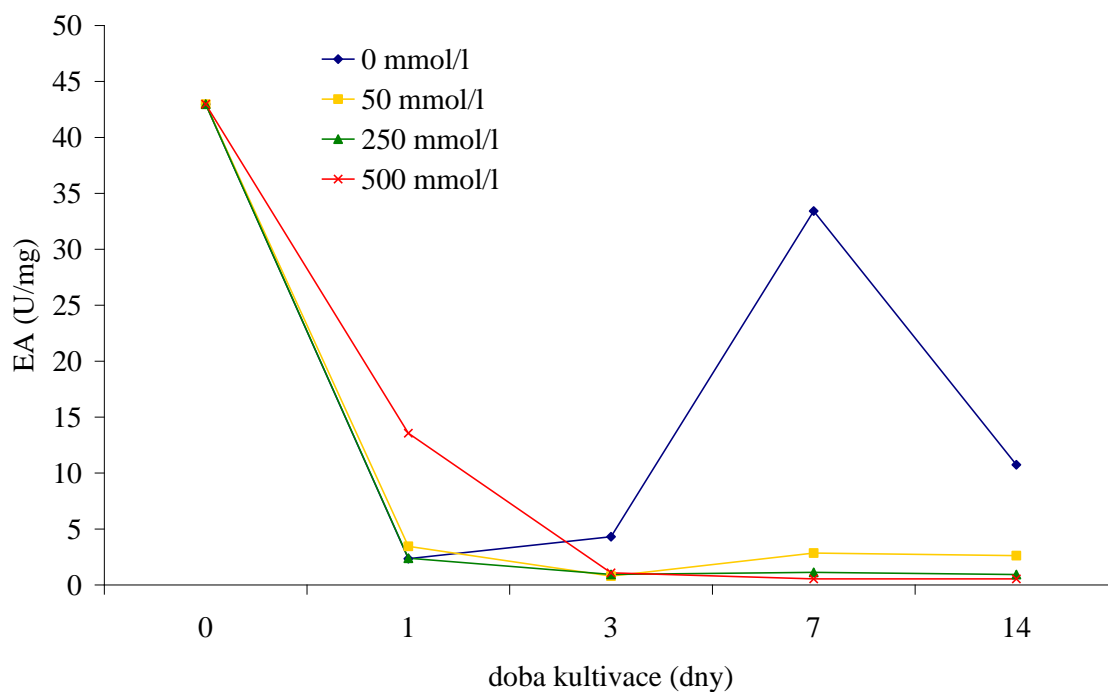
graf 37 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) ve stoncích rostliny *Allium sativum* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát ABTS



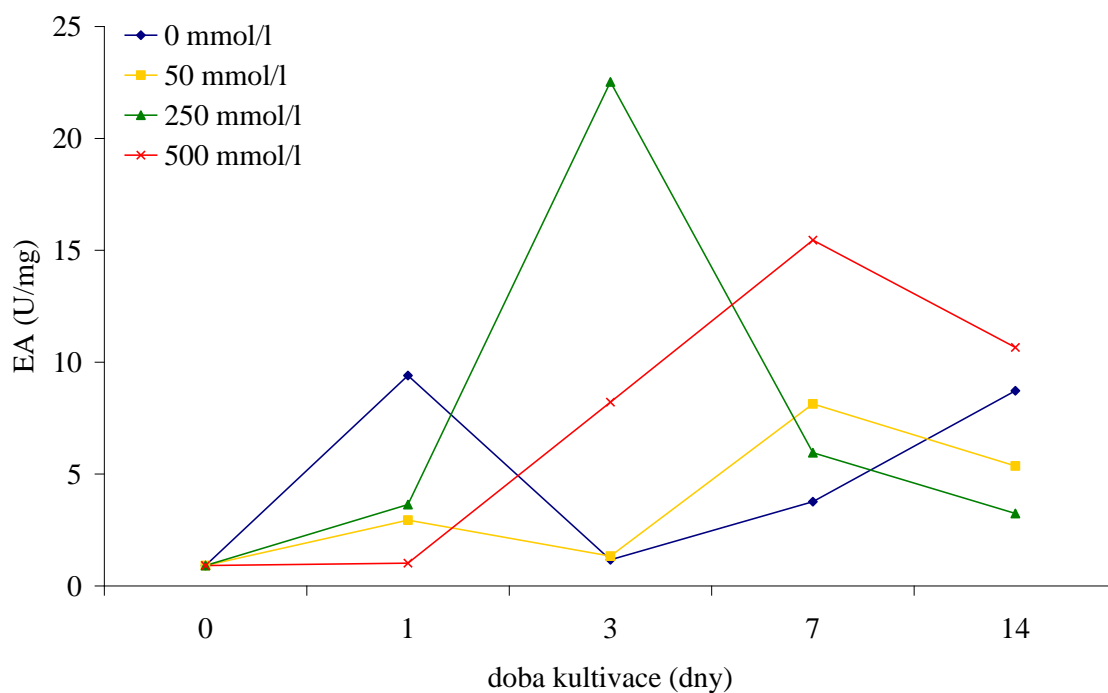
graf 38 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v listech rostliny *Allium sativum* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát ABTS



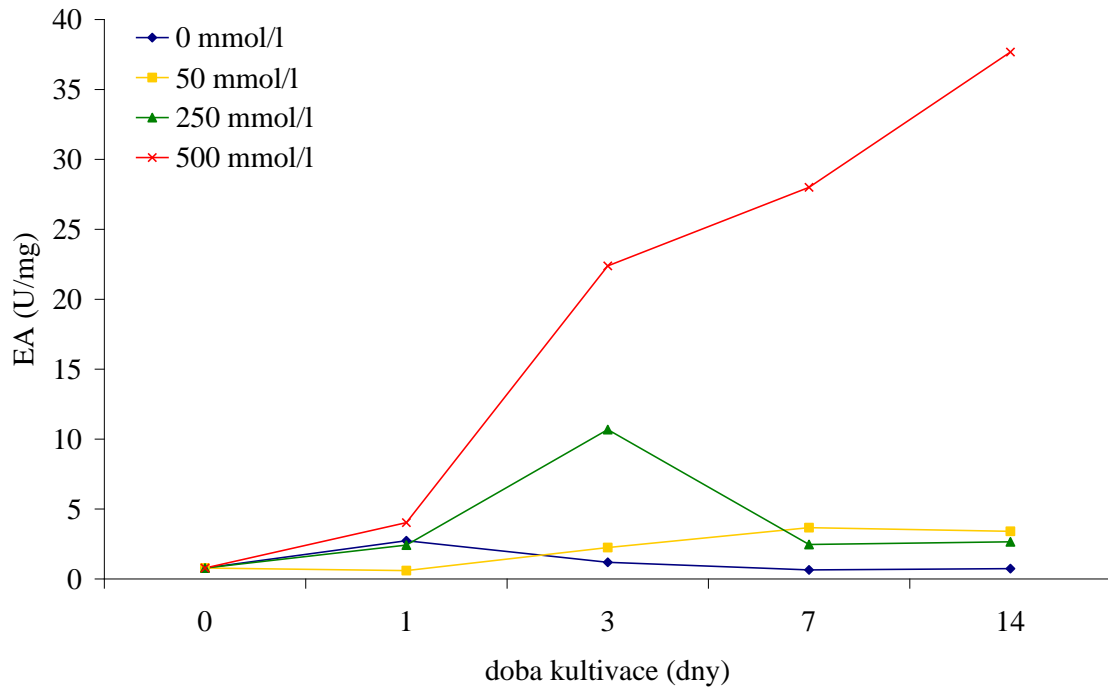
graf 39 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v kořenech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát guajakol



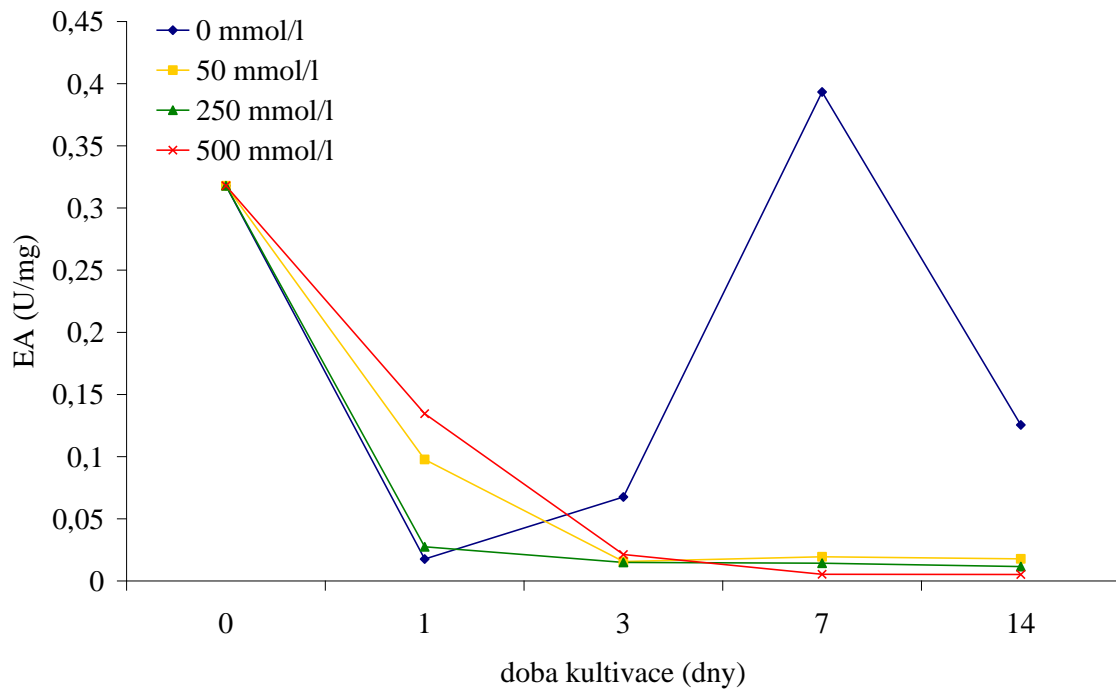
graf 40 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) ve stoncích rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát guajakol



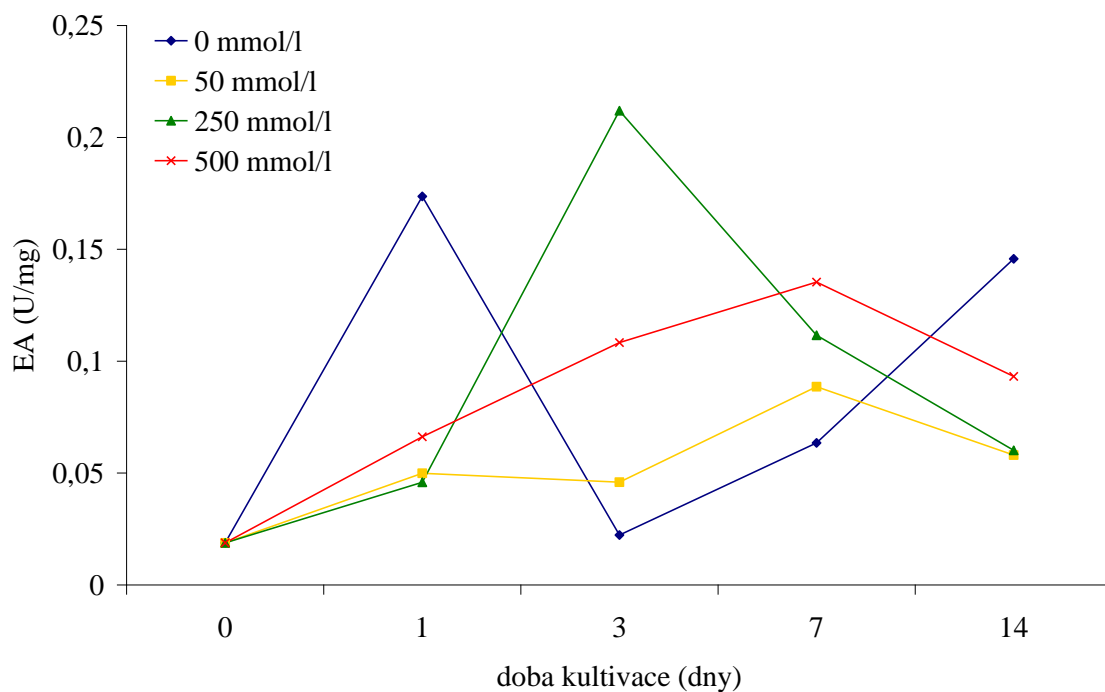
graf 41 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát guajakol



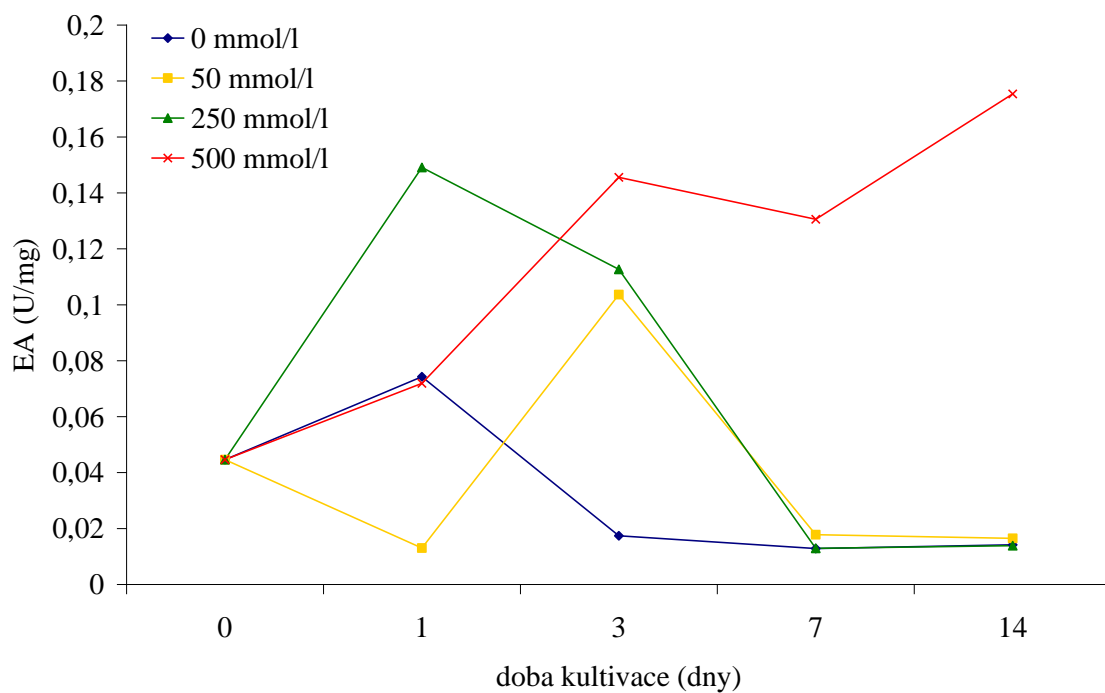
graf 42 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v kořenech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát ABTS



graf 43 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) ve stoncích rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát ABTS



graf 44 : Obsah peroxidasy (U/mg proteinů) v listech rostliny *Elsholtzia splendens* v průběhu kultivace na hydroponickém médiu měřený přes substrát ABTS



5. DISKUZE

Pro naše experimenty s akumulací mědi jsme vytipovali osm druhů rostlin s různými vlastnostmi a potenciálem využití pro fytoremediace. Česnek (*Allium sativum*) byl vybrán kvůli produkci thiosulfínátů jako např. allicin, které obsahují thiolové skupiny. Thiolová skupina se účastní vazeb např. v komplexech toxických kovů s fytochelatiny. Proto jsme předpokládali, že také thiosulfínáty se mohou podílet v česneku na detoxifikaci mědi. Ječmen (*Hordeum vulgare*) byl vybrán jako zástupce jednoděložných travin, které jsou známy svým odlišným metabolismem síry, která je přítomna v thiolových skupinách vážících těžké kovy. Silenka (*Silene vulgaris*) a *Elsholtzia splendens* jsou představitelé rostlin označovaných v literatuře jako „exkludery“, což jsou rostliny, které obsahují konstantní množství těžkého kovu bez ohledu na koncentraci tohoto kovu v okolním prostředí. Tabák (*Nicotiana tabacum*) je běžně používanou modelovou rostlinou pro vědecké experimenty. Lupina bílá (*Lupinus albus*) a žlutá (*Lupinus luteolus*) mají mohutný kořenový systém, vyhovují jim převážně kyselé půdy a dobře snášejí pěstování na méně úrodných půdách. Díky známým agrotechnickým lhůtám by mohly být vhodné pro případné využití při fytoremediacích. Okurka (*Cucumis sativa*) byla zvolena jako zástupce rostlin používaných při ekotoxikologických testech umožňujících stanovit toxicitu kontaminovaných půd a vod.

Z našeho experimentu vyplývá, že nejlepším akumulátorem mědi byla okurka a lupina bílá. Byly schopny akumulovat vysoká množství mědi v kořenovém systému, ale zvláště v případě okurky nedocházelo k výraznému transportu do nadzemní části, což je jedna z důležitých podmínek pro využití při fytoremediacích. Také nárůst biomasy byl silně redukován a v případě okurky došlo k devastaci kořenového systému a k úhynu rostlin už po sedmi dnech kultivace. U silenky a *Elsholtzia splendens* bylo povrženo, že jsou exkludery mědi, protože se její koncentrace v průběhu kultivace v rostlinách zvyšovala jen minimálně bez ohledu na koncentraci mědi v kultivačním médiu. U česneku bylo nalezeno relativně malé množství mědi v kořenech a také transport do zásobní cibule a do listů byl velmi malý. Produkce sirných látek jako je alliin nemá zřejmě na schopnost akumulace mědi podstatný vliv. Tabák sice neakumuloval vysoká množství mědi v nadzemní části, ale vzhledem k jeho vysoké produkci biomasy by se mohl při fytoremediacích uplatnit.

V druhém experimentu jsme se zaměřili na ověření poznatku, že měď je také významným stresovým faktorem rostlinného metabolismu a tudíž indukuje nebezpečné volné radikály. Ty jsou detoxifikovány několika antioxidantními systémy, kterých se účastní enzymy jako např. peroxidasa, katalasa a superoxid dismutasa. V našem experimentu jsme stanovovali peroxidasu pomocí dvou substrátů (guajakol a ABTS), protože je známo, že guajakol

poskytuje pohled na celkový obsah peroxidasy a substrát ABTS na určitou část izoenzymů. V obou testovaných rostlinách bylo detekováno výrazné množství peroxidasy v kořenech na počátku experimentu, což bylo zřejmě způsobeno stresem vzniklým při jejich přizpůsobení na hydroponické médium. Stres způsobený přítomností měďnatých iontů se především u česneku začal projevovat až po 14 dnech kultivace. Ve stoncích byla peroxidasa indukována od počátku kultivace s měďnatými ionty a určité kolísání hodnot v průběhu kultivace mohlo být způsobeno mnoha faktory od kultivačních podmínek až po chyby při zpracování a měření odebraných vzorků. V případě listů byl u česneku pozorován výrazný pokles aktivity v počátcích kultivace na rozdíl od *E. splendens*, kde aktivita v listech od počátku stoupala. Tyto rozdíly v chování můžou být způsobeny příslušností *E. splendens* do skupiny exkluderů mědi (tudiž mají odlišný metabolismus od ostatních rostlin).

Dalším indikátorem stresu rostlin bylo množství chlorofylu a karotenoidů v listech. Množství chlorofylu, který je důležitou součástí fotosyntézy, vypovídá o vitalitě rostliny a mezi jednu z funkcí karotenoidů patří ochrana fotosyntetického aparátu. U obou testovaných rostlin (*Allium sativum* a *Elsholtzia splendens*) nebyla pozorována výraznější změna v obsahu fotosyntetických pigmentů. Množství chlorofylu **b** zůstávalo na relativně konstantní hladině. Pouze chlorofyl **a** a v případě česneku i karotenoidy vykazovaly určitý pokles ke konci kultivace. Stejně jako v případě peroxidasové aktivity není zřejmě vliv toxicity mědi na rostlinný metabolismus okamžitý, ale projevuje se až se zpožděním.

6. ZÁVĚR

Příjem mědi je závislý na druhu rostliny a koncentraci kontaminantu v kultivačním médiu. Největší množství akumulované mědi bylo nalezeno v rostlinách *Cucumis sativa* a *Lupinus albus*. Měď je přednostně translokována v kořenovém systému, následně ve stoncích a pak v listech. Množství mědi v listové části je většinou na úrovni kontrolních rostlin. Výrazná toxicita mědi byla pozorována u rostlin *Cucumis sativa* a *Lupinus luteolus* kde docházelo k destrukci kořenového systému a následnému úhynu rostliny.

U testovaných rostlin *Allium sativum* a *Elsholtzia splendens* nebyly nalezeny statisticky významné změny na úrovni peroxidasové aktivity ani v obsahu fotosyntetických pigmentů v porovnání s kontrolními rostlinami. Došlo pouze k určitému snížení obsahu karotenoidů a chlorofylu při nejvyšší testované koncentraci 500 mM Cu^{2+} . Dále byl detekován rozdíl v produkci peroxidasy v listech testovaných rostlin.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Moldan B.: *Ekologická dimenze udržitelného rozvoje*, CUPRES, Praha 1999
- ² Shtangeeva I. : *Trace and ultratrace elements in plants and soil*, Wit press, 2005
- ³ http://www.irz.cz/latky/polycyklicke_aromati (stáhnuto : 15.07.2009)
- ⁴ http://www.irz.cz/repository/latky/polychlorovane_bifenyly.pdf (stáhnuto : 15.07.2009)
- ⁵ http://www.toxiny.webz.cz/polychlorovane_bifenyly_.htm (stáhnuto : 15.07.2009)
- ⁶ <http://www.irz.cz/latky/PCDDaPCDF> (stáhnuto : 15.07.2009)
- ⁷ Jizba J.: *Metoda odstraňování těžkých kovů z půdy*
<http://stary.biom.cz/sborniky/sb95vana/jizba.html> (stáhnuto 23. ledna.2009)
- ⁸ Peer W. A.: *Phytoremediation and hyperaccumulators plants*, Purdue University, USA
- ⁹ Cannon H. : Botanical prospecting for ore deposits. *Science* 132:591, 1960
- ¹⁰ Brooks R.. : *Phytochemistry of hyperaccumulators*, Vysoká In: Brooks RR, ed. *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, New York, 1998: CAB International
- ¹¹ Pivetz B. E.: *Ground Watter Issue : Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites*, EPA
http://clu-in.org/download/remed/epa_540_s01_500.pdf, staženo 6. ledna 2007
- ¹² Procházka S. : *Botanika a morfologie a fyziologie rostlin*, MZLU v Brně, 1998
- ¹³ Penka M. : *Všeobecná botanika, lesnická botanika I.*, Vysoká škola zemědělská v Brně, 1980
- ¹⁴ Voet D., Voet J. G.: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, 1995
- ¹⁵ Freeman J.L., Persans M. W., Nieman K., Albrecht C., Peer W. A., Pickering I. J., Salt D. E. : Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16:2176-2191, 2000
- ¹⁶ Wang J., Nielsen M.T., Evangelou V.P. : A solution culture study of Mn-sensitive and tolerant tobacco genotypes. *J. Plant Nutr.* 17:1079-1093, 1994
- ¹⁷ Van Huysen T., Abdel-Ghany S., Hale K.L., LeDuc D., Terry N., and Pilon-Smits E.A.H. : Overexpression of cystathionine- γ -synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* 218, 71–78, 2003
- ¹⁸ Peer W., Baxter I., Richards E., Freeman J., Murphy A. : Phytoremediation and hyperaccumulator plants : <http://hort.purdue.edu/hort/research/murphy/pdfs/metals11.pdf> (staženo : 15.07.2009)
- ¹⁹ USGS, 2004
- ²⁰ Alloway B.J. : *Heavy metals in soils. 2nd ed.*, Blackie Acad, London, 1995

- ²¹ Kabata-Pendias A, Pendias H : *Trace elements in soils and plants, 3rd ed.*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001
- ²² Aaseth J., Norseth T., Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. : *Handbook on the toxicology of metals. 2nd ed., vol 2: Specific metals*, Elsevier, New York: 233–254, 1986
- ²³ Jansson G. : Cadmium in arable crops: The influence of soil factors and liming. *Doctoral Thesis*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2002
- ²⁴ Eriksson J.E. : Concentrations of 61 trace elements in sewage sludge, farmyard manure, mineral fertilizers, precipitation and in oil and crops, *Swedish EPA Rep 5159*, Stockholm, 2001a
- ²⁵ Kabata-Pendias A., Pendias H. : *Biogeochemistry of trace elements*, 2nd ed., Wyd Nauk PWN, Warszawa (in Polish), 1999
- ²⁶ Ponizovsky A.A., Thakali S., Allen H.E., Di Toro D.M., Ackerman A.J. : Effect of soil properties on copper release in soil solution at low moisture content. *Environmental Toxic Chemistry* 25:671–682, 2006
- ²⁷ Allen H.E. : The significance of trace metal speciation for water, sediment and soil quality criteria, and standards. In: Sloof W, de Kruijf H (eds) Proc 2nd Intern European Conference on Ecotoxicology, *Scientific Total Environmental*, Suppl 1, pp 23–45, 1993
- ²⁸ Kabata-Pendias A., Sadurski W. : Trace elements and compounds in soil. In: Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoeppler M. (eds) Elements and their compounds in the environment, *Wiley-VCH*, Weinheim, 2nd ed., pp 79–99, 2004
- ²⁹ Zhou L.X., Wong J.W.C. : Behavior of heavy metals in soils: effect of dissolved organic matter. In: Selim H.M., Kingery W.L. (eds) *Geochemical and hydrological reactivity of heavy metals in soils*. Lewis Publ, Chelse, MI, pp 245–269, 2003
- ³⁰ Ma Y.B., Lombi E., Nolan A.L., McLaughlin M. : Short-term natural attenuation of copper in soils: effect of time, temperature, and soil characteristics. *Environmental Toxicology Chemistry* 25:652–658, 2006
- ³¹ Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B. : *Trace Elements from Soil to Human*, Springer Berlin Heidelberg, 257-282, 2007
- ³² Eckel H., Roth U., Döhler H., Nicholson F., Unwin R. : Assessment and reduction of heavy metal input into agro-ecosystems. *Final rep. EU-Concerted Action AROMIS*, KTBL-Schrift, Darmstadt, 2005
- ³³ Kikkilä O. : Remediation through mulching with organic matter of soil polluted by a copper-nickel smelter. *Ph.D Thesis*, University of Helsinki, Helsinki, 2002

- ³⁴ Nozaki Y. : A fresh look at element distribution in the North Pacific, *AGU* [.\(http://www.agu.org/eos.elec/97025e.html.\)](http://www.agu.org/eos.elec/97025e.html), 2005
- ³⁵ Reimann C., de Caritat P. : *Chemical elements in the environment*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1998
- ³⁶ USEPA, 1980
- ³⁷ Witczak S., Adamczyk A. : Catalog of selected physical and chemical indices for ground water contamination, and analytical methods. *Bibliotheka Monitoring Źrodowiska*, Warszawa, 1995
- ³⁸ Matschullat J., Tobschall H.J., Voigt H.-J. : *Geochemie und Umwelt*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1997
- ³⁹ Gaillardet J., Viers J., Dupré B. : Trace elements in river waters. In: Drever JI (ed) *Surface and ground water, weathering and soils* In: Holland HD, Turekian KK (eds) *Treatise on geochemistry*. Elsevier, Oxford 5:225–227, 2003
- ⁴⁰ Hodson P.V., Borgmann U., Shear H. : Toxicity of copper to aquatic biota. In: *Nriagu JO (ed) Copper in the environment. Part II. Health effect*, Wiley, New York, pp 307–372, 1979
- ⁴¹ Luoma S.N. : Bioavailability of trace metals to aquatic organisms – a review, *Science of the total Environment*, 28:1–22, 1983
- ⁴² Szefer P. : Metal pollutants and radionuclides in the Baltic Sea – an overview, *Oceanologia*, 44:129–178, 2002b
- ⁴³ Kennish M.J. : Trace metal-sediment dynamics in estuaries: Pollution assessment, *Environmental Contamination & Toxicology*, 155:69–110, 1998
- ⁴⁴ Helios-Rybicka E. : Phase-specific bonding of heavy metals in sediments of the Vistula River, *Applied Geochemistry*, Suppl Issue 2:45–48, 1993
- ⁴⁵ WHO 1998
- ⁴⁶ Livett E.A. : Heavy metal pollution of the atmosphere. In: Nierenberg WA (ed) *Encyclopedia of Earth system science*, Acad Press, San Diego, 2, pp 507–518, 1992
- ⁴⁷ Pacyna J.M., Pacyna E.G. : An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources, *Environmental Review*, 9:269–298, 2001b
- ⁴⁸ Berg T., Steinnes E. : Recent trends in atmospheric deposition of trace elements in Norway as evident from the 1995 moss survey, *Science of the Total Environment*, 208:197–206, 1997
- ⁴⁹ Rühling L., Rasmussen L., Pilegaard K., Mäkinen A., Steinnes K. : Survey of atmospheric heavy metal deposition in Nordic Countries in 1985, *Report for Nordic Council of Ministers*, Kopenhagen, 1987

- ⁵⁰ Nicholson F.A., Smith S.R., Alloway B.J., Carlton-Smith C., Chambers B.J. : An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales, *Science of the Total Environment*, 311:205–219, 2003
- ⁵¹ Cunningham S.D., Shann J.R., Crowley D.E., Anderson T.A. : Phytoremediation of contaminated water and soil. In: Kruger EL, Anderson TA, Coats JR (eds) Phytoremediation of soil and water contaminants. ACS Symposium Series 664, *Journal of the American Chemical Society*, Washington DC, pp 2–19, 1997
- ⁵² Schroeder W.H., Dobson M., Kane D.M. : Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: A review, *Air Pollution Control Association*, 37:1267–1285, 1987
- ⁵³ Ensminger A.H., Ensminger M.E., Konlode J.E., Roson J.R.K. : *The concise encyclopedia of foods and nutrition*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995
- ⁵⁴ Read H.J., Martin M.H. : The effect of heavy metals on populations of small mammals from woodlands in Avon (England) with particular emphasis on metal concentrations in *Sorex araneus* L. and *Sorex anaden* L., *Chemosphere*, 27:2197–2211, 1993
- ⁵⁵ Lepp N.W., Dickinson N.M. : Fungicide-derived copper in tropical plantation crops. In: Ross SM (ed) *Toxic metals in soil-plant systems*. Wiley, Cichester, pp 367–396, 1994
- ⁵⁶ Heliövaara K., Väisänen R. : Concentrations of heavy metals in the food, faeces, adults, and empty cocoons of *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera, Diprionidae), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45:13–18, 1990
- ⁵⁷ Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.M.D., Reeves R.D. : The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants, *Resources, Conservation and Recycling*, 11:41–49, 1994
- ⁵⁸ Hutchinson T.C. : Copper contamination of ecosystem caused by smelter activities. In: Nriagu J.O., (ed) *Copper in the environment. Part I: ecological cycling*. Wiley, New York, pp 451–502, 1979
- ⁵⁹ Jenkins D.W. : Biological monitoring of toxic trace metals. *Toxic trace metals in plants and animals of the world*, U.S. EPA, Reps. 600/3–80–092, pp 1130–1148, and 600/3–80–091, pp 504–982, 1980
- ⁶⁰ Shtangeeva I. : *Trace and Ultratrace Elements in Plants and Soils*, WITpress, 2005
- ⁶¹ Davies B. E. : Trace metals in the environment : retrospect and prospect. *Biogeochemistry of Trace Metals*. Ed. Adriano D.C., Lewis Publishers : Boca Raton, Fl, pp. 1-17, 1992
- ⁶² Krishnamurti G.S.R., Naidu R. : Solution speciation and Phytoavailability of copper and zinc in soils, *Environmental Science and Technology*, 36:2645-2651, 2002

- ⁶³ Romkens P.F.A.M., Bouwman L.A., Boon G.T. : Effect of copper on plant growth and speciation in soil solution samples, *Environmental Pollution*, 106:315-321, 1999
- ⁶⁴ Zhang H., Davison W., Knight B., McGrath S.P. : In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT, *Environmental Science & Technology*, 32:704-710, 1998
- ⁶⁵ Zhang H., Davison W., Knight B., McGrath S.P. : In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT, *Environmental Science & Technology*, 35:2602-2607, 2001
- ⁶⁶ Clemens S., Palmgren M.G., Kramer U. : A long way ahead : understanding and engineering plant metal accumulation, *TRENDS in Plant Science*, 7:309-315, 2002
- ⁶⁷ Rae T.D., Schmidt P., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. : Undetectable intracellular free copper : The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase, *Science*, 284:805-808, 1999
- ⁶⁸ O'Halloran T.V., Culotta V.C. : Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions, *Journal of Biological Chemistry*, 275:25057-25060, 2000
- ⁶⁹ Himelblau E., Amasino R.N. : Delivering copper within plant cells, *Current Opinion in Plant Biology*, 3:205-210, 2000
- ⁷⁰ Grusak M.A., Pearson J.N., Marentes E. : The physiology of micronutrient homeostasis in field crops, *Field Crops Research*, 60:41-56, 1999
- ⁷¹ Welch R.M., Norvell W.A., Schaefer S.C., Shaff J.E., Kochian L.V. : Introduction of iron(iii) and copper (ii) reduction in pea (*Pisum sativum L*) roots by Fe and Cu status – does the root-cell plasmalemma Fe(iii)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake, *Planta*, 190:555-561, 1993
- ⁷² Holden M.J., Crimmins Jr T.J., Chaney R.L. : Cu²⁺ reduction by tomato root plasma membrane vesicle, *Plant Physiology*, 108:1093-1098, 1995
- ⁷³ Hirsch R.E., Lewis B.D., Spalding E.P., Sussman M.R. : A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition, *Science*, 280:918-921, 1982
- ⁷⁴ Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L. : Emerging mechanism for heavy metal transport in plants, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1465:104-126, 2000
- ⁷⁵ Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L. : Emerging mechanism for heavy metal transport in plants, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1465:104-126, 2000
- ⁷⁶ Cobbett C.S., : Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification, *Plant Physiology*, 123:825-833, 2000

- ⁷⁷ Zhu Y.L., Pilon-smits E.A.H., Tarun A.S., Weber S.U., Jouanin L., Terry N. : Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcystein synthetase, *Plant Physiology*, 121:1169-1178, 1999
- ⁷⁸ Tester M., Leigh R.A. : Partitioning of nutrient transport processes in roots, *Journal of Experimental Botany*, 52:445-457, 2001
- ⁷⁹ Gaymard F., Pilot G., Lacombe B., Bouchez D., Bruneau D., Boucherez J., Michaux-Ferriere N., Thibaud J.B., Sentenac H. : Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap, *Cell*, 94:647-655, 1998
- ⁸⁰ Scholz G., Seifert K., Grun M. : the effect of nicotianamide on the uptake of Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Rb⁺, and PO₄³⁻ by the tomato mutant *chloronerva*, *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 182:189-194, 1987
- ⁸¹ Kochian L.V : Mechanism of micronutrient uptake and transport in plants, *Micronutrients in Agriculture (2nd edition)*, ed. Mortverd J.J., Cox F.R., Shuman L.R., Welch R.M., Soil Science of America, Madison, WI., 229-296, 1991
- ⁸² White M., Decker A.M., Chaney R.L. : Metal complexation in the xylem fluid I., Chemical composition of tomaty and soybean stem exudates, *Plant Physiology*, 67:333-339, 1981a
- ⁸³ White M., Baker F., Chaney R.L., Decker A.M. : Metal complexation in the xylem fluid II., Theoretical equilibrium model and computational computer program, *Plant Physiology*, 67:301-310, 1981b
- ⁸⁴ Pilch A., Scholz G. : Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon exculentum* Mill.) : nicotianaminestimulated copper transport in the xylem, *Journal of Experimental Botany*, 47:41-47, 1996
- ⁸⁵ Loneragan J.F. : Distribution an movement of copper in plants, *Copper in soils and plants*, ed Loneragan J.F., Robson A.D., Graham R.D., Academic Press : New York, 165-188, 1981
- ⁸⁶ Loneragan J.F., Snowball K., Robson A.D. : Copper supply in relation to content and redistribution among organs of the wheat plant, *Annals of Botany*, 45:621-632, 1980
- ⁸⁷ Hocking J.P., Pate J.S. : Mobilisation of minerals to developing seeds of legumes, *Annal of Botany*, 41:1259-1278, 1977
- ⁸⁸ Baron M., Arellano J.B., George J.L. : Copper and photosystem II – a controversial relationship, *Physiologia Plantarum*, 94:174-180
- ⁸⁹ Sandmann G., Boger P. : Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosyntetic membranes, *Plant Physiology*, 66:797-800, 1980
- ⁹⁰ Van Assche F., Clijster H. : Effects of metal on enzyme activity in plants, *Plant Cell and Environment*, 13:195-206, 1990

- ⁹¹ Fernandes J.C., Henriques F.S. : Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants, *Botanical Review*, 57:246-273, 1991
- ⁹² Jegerschold C., Arellano J.B., Schroder W.P., Vankan P.J.M., Baron M., Styring S. : Copper(ii) inhibition of electron-transfer through photosystem-ii studied by EPR spectroscopy. *Biochemistry*, 34:12747-12754, 1995
- ⁹³ Szalontai B., Horváth L.I., Debreczeny M., Droppa M., Horváth G. : Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy, *Photosynthesis Research*, 61:241-252, 1999
- ⁹⁴ Maksymiec W., Russa R., Urbaniksygniewska T., Baszynski T. : Change in acyl lipid and fatty-acid composition in thylakoids of copper nontolerant spinach exposed to excess copper, *Journal of Plant Physiology*, 140:52-55, 1992
- ⁹⁵ Cuypers A., Vangronsveld J., Clijsters H. : Effects of copper toxicity on leaves of Oregano, *Physiologia Plantarum*, 110:512-517, 2000
- ⁹⁶ Wojcik M., Tukendorf A. : Response of wild type Arabidopsis thaliana to copper stress, *Biologica Plantarum*, 46:57-67, 2003
- ⁹⁷ Lepp N.W., Hartley J.R., Toti M., Dickinson N.M. : Patterns of soil copper contamination and temporal changes in vegetation in the vicinity of a copper rod rolling factory, *Environmental Pollution*, 95:363-369, 1997
- ⁹⁸ Antonovics J., Bradshaw A.D., Turner R.G. : Heavy metal tolerance in plants, *Advances in Ecological Research*, 7:1-85, 1971
- ⁹⁹ Lepp N.W. : Bryophytes and Pteridophytes, Metal in the Environment. *Analysis by Biodiversity*, ed Prasad M.N.V., Derek M. : New York, 159-170, 2001
- ¹⁰⁰ van Hoof N.A.L.M., Koevoets P.L.M., Hakvoort H.W.J., Ten Bookum W.M., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. : *Physiologia Plantarum*, 113:225-232, 2001
- ¹⁰¹ Ye Z.H., Baker A.J.M., Wong M.H., Willis A.J. : Copper tolerance, uptake and accumulation by *Phragmites australis*, *Chemosphere*, 50:795-800, 2003
- ¹⁰² McNaughton S.J., Folsom T.C., Lee T., Park F., Price C., Roeder D., Schmitz J. Stockwell C. : Heavy metal tolerance in *Typha latifolia* without the evolution of tolerant races, *Ecology*, 55: 1163-1165, 1974
- ¹⁰³ Taylor G.J., Crowder A.A. : Copper and nickel tolerance in *Typha latifolia* clones from contaminated and uncontaminated environments, *Canadian Journal of Botany*, 62:1304-1308, 1984

- ¹⁰⁴ McCabe O.M., Baldwin J.L., Otte M.L. : Metal tolerance in wetland plants? *Minerva Biotechnologia*, 13:141-149, 2001
- ¹⁰⁵ McGrath S.P., Zhao F.J., Lombi E. : Advances in Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides, *Advances in Agronomy*, 75:1-56, 2002
- ¹⁰⁶ Brooks R.R. : *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, CAB international : wallingford, 1998
- ¹⁰⁷ Köhl K.I., Smith J.A.C. : Metal allocation patterns in cuprophytes from the Zairean copper belt contrast with those of nickel hyperaccumulation, *Journal of Experimental Botany (Suppl.)*, 48:103, 1997
- ¹⁰⁸ Schatz A. : Speculations on the ecology and photosynthesis of the 'copper mosses', *Bryologist*, 58:113-120, 1955
- ¹⁰⁹ Kiikkila O., Perkiomaki J., Barnette M., Derome J., Pennanen T., Tulisalo E., Fritze H. : In situ bioremediation through mulching of soil polluted by a copper-nickel smelter, *Journal of Environmental Quality*, 30:1134-1143, 2001
- ¹¹⁰ McBride M.B., Martinez C.E. : Copper phytotoxicity in a contaminated soil : Remediation tests with adsorptive materials, *Environmental Science and Technology*, 34:4386-4391, 2000
- ¹¹¹ Lepp N.W. : Case studies in the field – Industrial sites. The Prescott copper rod plant, *Metal-Contaminated Soil, In situ inactivation and phytoremediation*, ed Vangronsveld J., Cunningham S. Springer Verlag : Berlin, 217-218, 1998
- ¹¹² <http://www.botany.cz/cs/silene-vulgaris/> (stáhnuto : 15.05.2009)
- ¹¹³ <http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3rnic.html> (stáhnuto : 15.05.2009)
- ¹¹⁴ http://cs.wikipedia.org/wiki/Česnek_kuchyňský (stáhnuto : 15.05.2009)
- ¹¹⁵ <http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=40> (stáhnuto : 15.05.2009)
- ¹¹⁶ http://old.mendelu.cz/~agro/af/systematika/ucebni_text/seminarky/okurka_seta.rtf (stáhnuto : 15.05.2009)
- ¹¹⁷ http://biologie.amoskadan.cz/files/pr/Jecmen_sety.pps (stáhnuto : 09.06.2009)
- ¹¹⁸ <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ječmen> (stáhnuto : 09.06.2009)
- ¹¹⁹ <http://old.mendelu.cz/~agro/af/picniny1/uctext/sklady.php?odkaz=lupina.html> (stáhnuto : 09.06.2009)
- ¹²⁰ <http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3rlup.html> (stáhnuto : 09.06.2009)
- ¹²¹ http://en.wikipedia.org/wiki/Elsholtzia_ciliata (stáhnuto : 09.06.2009)
- ¹²² <http://dendro.mojzisek.cz/rod.php?id=176> (stáhnuto : 09.06.2009)

¹²³ Lichtenthaler H. K. : Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in enzymology*, 148:350-382, 1987

¹²⁴ Hiner A.N.P., Rodríguez – López, J.N., Arnao M.B., Lloyd E.R., García – Cánovas, F., Acosta M.: Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxidase, *Biochemical Journal*, Vol. 348, 2001:321

¹²⁵ Chance B., Maehly A.C. : Assay of catalases and peroxidases, 1995, *Methods of Enzymology 2*, Vol. 2, 764 – 817, ed. Colowick S.P., Kaplan N.O., Academic Press Inc., Publishers New York, 1995