

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Katedra biochemie

Působení kadmiových iontů na chlorofyl *a* a *b* v thylakoidní
membráně a v methanolovém extraktu

Effect of cadmium ions on chlorophylls *a* and *b* in the thylakoid
membrane and in methanolic extract



Tereza Emmerová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

2008

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*ř.č. 142 b/08 stud
(broch.)*

Chci poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování bakalářské práce.

Zároveň děkuji své rodině se všestrannou podporu v průběhu celého studia.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Kučery, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 3.9.2008



Tereza Emmerová

OBSAH

Obsah	3
Seznam zkratek	5

TEORETICKÁ ČÁST

1. Dopad kadmia na živé organismy	6
2. Kadmium a fotosyntéza	7
2.1 Obecná charakteristika oxygení fotosyntézy.....	7
2.2 Vliv kadmia na fotosyntézu.....	9
3. Kadmium a fotosyntetické pigmenty	11
3.1 Rostlinné pigmenty.....	11
3.1.1 Chlorofyly.....	11
3.1.2 Karotenoidy.....	12
3.2 Vliv kadmia na obsah fotosyntetických pigmentů.....	13
4. Jak se rostliny působení kadmia brání	15
5. Cíl práce	16

PRAKTICKÁ ČÁST

6. Materiál a metody	17
6.1 Použité přístroje.....	17
6.1.1 Sestava pro HPLC.....	17
6.1.2 Nastavení kapalinového chromatografu.....	17
6.1.3 Chromatografický software ECOMAC.....	18
6.2 Použité chemikálie a rostlinný materiál.....	18
6.3 Přímé působení chloridu kademnatého na chlorofyly v methanolovém extraktu.....	18
6.3.1 Příprava extraktu ze špenátových listů.....	18
6.3.2 Separace rostlinných pigmentů pomocí HPLC.....	18
6.3.3 Feofytinizace chlorofylu.....	19
6.3.4 Určení elučních časů feofytinů.....	19
6.3.5 Inkubace chlorofylu s kadmiem.....	20
6.4 Působení chloridu kademnatého na chlorofyly v thylakoidních membránách.....	20

7. Výsledky	22
7.1 Chromatogramy a absorpční spektra chlorofylů a feofytinů.....	22
7.2 Přímé působení chloridu kademnatého na chlorofyly v methanolovém extraktu.....	25
7.3 Působení chloridu kademnatého na chlorofyly v thylakoidní membráně.....	28
8. Diskuse	30
9. Závěr	33
Seznam použité literatury	34

SEZNAM ZKRATEK

5-ALA – kyselina 5-aminolevulová

ATP – adenosintrifosfát

Cd-Chl – chlorofyl, v jehož molekule byl atom hořčíku nahrazen kadmíem

Chl - chlorofyl

C_i – intracelulární koncentrace CO₂

GAPDH - glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

HEPES – N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(ethansulfonová kyselina)

HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického *high-performance liquid chromatography*)

HPS - proteiny teplotního šoku (z anglického *heat shock proteins*)

NADPH – nikotinamidadenosindinukleotidfosfát

PBG – porfobilinogen

PGK - 3-fosfoglycerátkinasa

PHQ – feofytinizační koeficient

P_N - rychlost čisté fotosyntézy

POR – protochlorofylidoxidoreduktasa

PSI – fotosystém I

PSII – fotosyntém II

RC – reakční centrum

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

TEORETICKÁ ČÁST

1. DOPAD KADMIA NA ŽIVÉ ORGANIZMY

Toxicita těžkých kovů je jeden z hlavních abiotických stresů, který vede k poškození zdraví u rostlin i u živočichů. V posledním desetiletí je toxicitě těžkých kovů věnována stále větší pozornost (Prasad, 1995). Kadmium je poměrně vzácný prvek, který nemá funkci esenciálního kovu v žádném živém organismu, proto je i v malých koncentracích pro živé organismy vysoce toxický (Lagriffoul a kol., 1998). V nedávné době bylo zjištěno, že výjimku tvoří mořská rozsivka *Thalassiosira weissflogii*, u které byl nalezen metaloenzym obsahující kadmium (Lane a kol., 2005). U savců se kadmium hromadí v játrech a ledvinách (Ouzounidou a kol., 1997) a je prokázáno, že má karcinogenní účinky. Rostliny přijímají kadmium kořeny a následně se hromadí ve všech částech jejich těla: v kořenech, stoncích, plodech atd. To je hlavní cesta, jak se kadmium dostává do potravního řetězce (Lagriffoul a kol., 1998). Bylo zjištěno, že asi 70 % kadmia, které se dostává do lidského těla, pochází z potravy rostlinného původu (Ouzounidou a kol., 1997). Kadmium je velmi dobře rozpustné ve vodě, z kontaminované vody tedy mohou být přímo zasaženi vodní živočichové, a to je další vstup kadmia do potravního řetězce (Lagriffoul a kol., 1998).

Kadmium je stříbrný, měkký, kujný a tažný kov, jehož nejběžnějším oxidačním stavem je +II. Má velmi nízkou teplotu tání - 765 °C, takže se snadno vypařuje a dostává do ovzduší. Kadmium je hojně užíváno v průmyslu, a to např. při výrobě baterií (Ni-Cd), stabilizaci polyvinylchloridu při výrobě plastů, v automobilovém průmyslu nebo k tvorbě ochranných povrchů a pokovování. Také bylo zjištěno, že některá fosfátová hnojiva obsahují vysoká množství kadmia (Prasad, 1995). Vysoké obsahy tohoto těžkého kovu v rostlinách jsou pozorovány na půdách, v jejichž matečné hornině se kadmium vyskytuje, nebo na půdách zasažených antropogenním působením (Lagriffoul a kol., 1998).

U rostlin kadmium způsobuje řadu závažných změn: vede k inhibici fotosyntézy, potlačení růstu, dochází k aktivaci či inhibici enzymů (Prasad, 1995). Kadmium ovlivňuje aktivity mnoha enzymů, jako např. enzymů Citrátového cyklu, pentosofosfátového cyklu (Lagriffoul a kol., 1998) nebo enzymů zapojených do biosyntézy chlorofylu (Dai a kol., 2006; Ouzounidou a kol., 1997). Dále mimo jiné zasahuje do činnosti průduchů, ovlivňuje vodní režim rostliny a při působení kadmia byl pozorován také vznik reaktivních forem kyslíku .

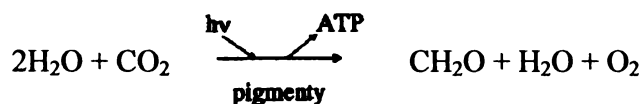
Existuje několik faktorů, které ovlivňují přístup kadmia do rostlin. Patří mezi ně především pH, množství chloridů nebo jiných těžkých kovů v půdě. Např. NaCl v půdě působí jako antagonist toxicity těžkých kovů. Přístup kadmia do rostlin snižuje vyšší koncentrace Ca^{2+} v půdě a nízké pH, protože ionty Ca^{2+} a ionty H^+ (při nízkém pH) soutěží s ionty Cd^{2+} o vazebné místo na membránových přenašečích (Prasad, 1995).

Rostliny si vyvinuly celou řadu ochranných mechanismů, které souží k detoxikaci kadmia. Mezi nejběžnější ochranné mechanismy patří: syntéza sloučen vázajících kadmium (fytochelatin) a jejich stabilizace sulfidovými ionty nebo další možností obrany je syntéza proteinů teplotního šoku (Prasad, 1995). Byly také objeveny rostliny, které jsou schopny akumulovat těžké kovy bez viditelného zpomalení růstu. Těto schopnosti se využívá v nových biotechnologických procesech zvaných fytoremediace (Zítka et. al, 2007).

2. KADMIUM A FOTOSYNTÉZA

2.1 Obecná charakteristika oxygení fotosyntézy

Život na zemi je závislý na slunci. Rostliny, řasy a sinice poutají světelnou energii a fotosyntézou ji mění na energii chemickou. Fotosyntéza je tedy pochod poháněný světlem, v němž se CO_2 váže tak, že vznikají sacharidy a jako vedlejší produkt se uvolňuje kyslík. Při oxygení fotosyntéze slouží jako donor protonů a elektronů voda. Fotosyntézu lze popsat zjednodušenou sumární rovnicí:

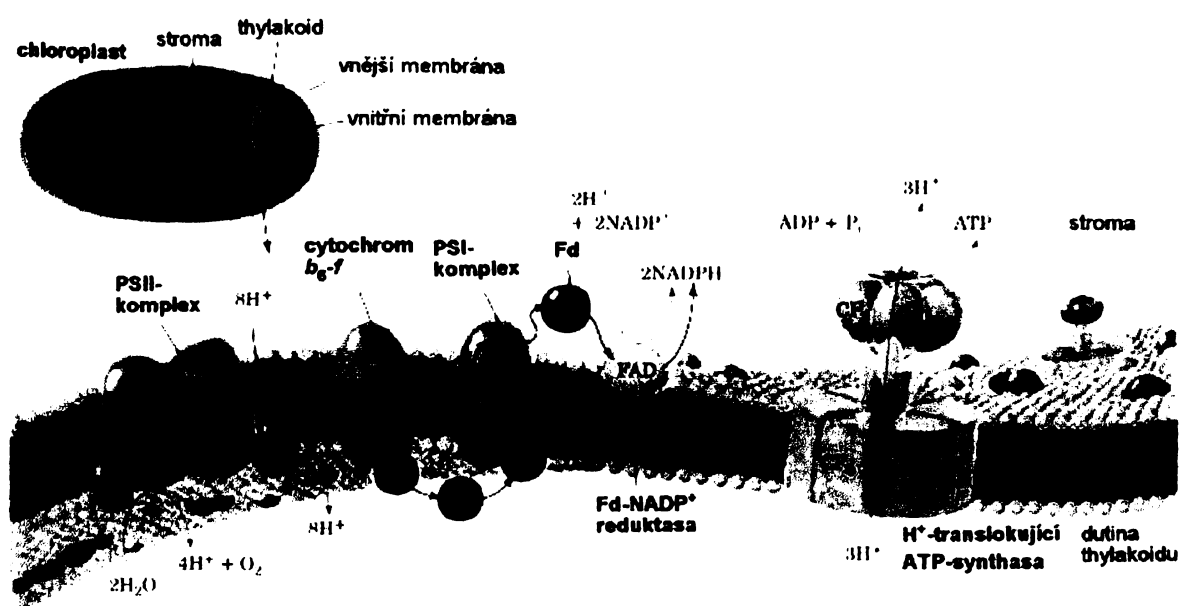


kde CH_2O značí vzniklý sacharid.

U řas a vyšších rostlin je fotosyntéza lokalizována v chloroplastech. Fotosyntetické procesy rozdělujeme do dvou fází: první fáze fotosyntézy se nazývá světelná neboli primární. Probíhá v thylakoidní membráně a dochází k absorpci energie světelného záření fotosyntetickými pigmenty a k tvorbě ATP a redukováných forem redukujících agens: ferredoxinu a NADPH. V této fázi se také uvolňuje kyslík. Následuje fáze sekundární neboli temnostní. V sekundární fázi jsou produkty primární fáze (ATP a NADPH) využity k fixaci atmosférického CO_2 a zabudování uhlíku do molekuly sacharidu v Calvinově cyklu. Sekundární fáze je lokalizována ve stomatu chloroplastů (Pavlová, 2005).

Primární fáze fotosyntézy probíhá na čtyřech supramolekulárních komplexech v thylakoidní membráně.

1. Fotosystém II (PSII) – katalyzuje rozklad vody za uvolnění molekulárního kyslíku. Prostřednictvím pohyblivých molekul pastochinonu je funkčně spojen s komplexem cytochromů b_6/f .
2. Cytochrom b_6/f – přenáší elektrony z PSII na PSI.
3. Fotosystém I (PSI) – elektron pro své reakční centrum získává z cytochromového komplexu b_6/f a jeho přenosem na feredoxin redukuje NADP^+ .
4. ATP-syntasa – využívá protonový gradient vytvořený přenosem elektronů k syntéze ATP na vnějším (stomatálním) povrchu thylakoidní membrány. (Procházka a kol., 1998)



Obr. 1: Schematické znázornění thylakoidní membrány a složek jejího řetězce přenosu elektronů.

Upraveno podle Voet a Voetová (1995).

Fotosystémy jsou tvořeny jádrem a periferním světlosběrným komplexem. Světlosběrné komplexy obsahují 200 až 300 molekul chlorofylu *a* i *b* a četné xanthofyly. Proteiny světlosběrných komplexů jsou integrální membránové proteiny, obsahují tři hydrofobní oblasti, které je kotví k membráně thylakoidu. K jednomu proteinu se váže 10 až 12 molekul chlorofylu (*a* i *b* v různých poměrech) a 2 až 3 molekuly xanthofylů. Jádra fotosystémů tvoří proteiny reakčního centra (RC), tzv. anténní komplex jádra (proteiny vázající chlorofyl *a* a β -karoten) a další strukturální proteiny.

Jádro PSII je tvořeno RC, hydrofobními proteiny, které vážou asi 40 molekul chlorofylu *a* a β -karoten, strukturálními proteiny a cytochromem b_{559} . Reakční centrum PSII je tvořeno dvěma

proteiny D1 a D2, na které se vážou dvě molekuly chlorofylu *a*. Chlorofyl *a* v této pozici má absorpční maximum při 680 nm a označuje se P680 (pigment s absorpčním maximem 680 nm). Na proteiny D1 a D2 jsou dále vázány přenašeče elektronu (feofytin, železo a dvě molekuly plastochinonu Q_A a Q_B). Součástí reakčního centra PSII je také komplex OEA (z anglického *oxygen evolving komplex*), v němž dochází k rozkladu vody a uvolňování kyslíku.

Jádro PSI je tvořeno RC a strukturálními proteiny, které vážou 50 až 100 molekul chlorofylu *a* a β -karoten. Reakční centrum PSI tvoří heterodimer hydrofobních proteinů PsaA a PsaB, na stomatární straně jsou připojeny hydrofobní podjednotky jádra PsaC a PsaD, na straně lumenu je asociována hydrofobní podjednotka PsaF. Na proteiny PsaA a PsaB se váže dimer chlorofylu *a*, který má absorpční maximum při 700 nm a značí se P700. Molekula chlorofylu *a* je první akceptor elektronu, značená A₀. Podjednotka PsaF zajišťuje interakci s plastocyaninem – donorem elektronu pro P700 (Pavlová, 2005).

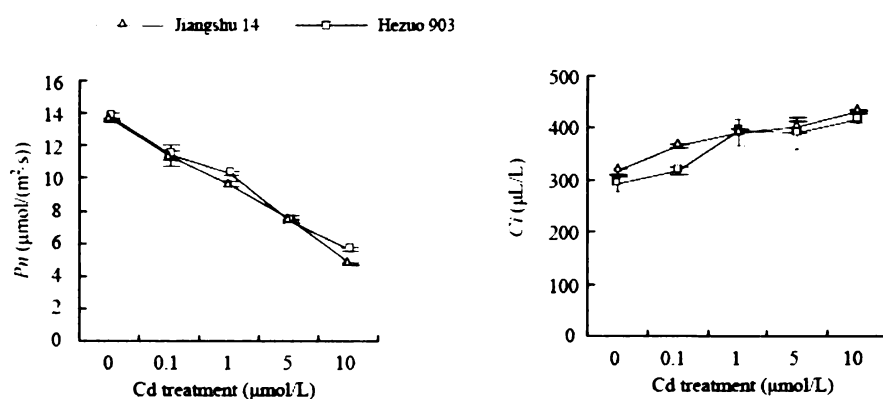
CO₂ se ve fotosyntéze váže enzymovými reakcemi Calvinova cyklu. V první části tohoto cyklu reagují tři molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu se třemi molekulami CO₂ za vzniku šesti molekul glycerinaldehyd-3-fosfátu, za spotřeby devíti molekul ATP a šesti molekul NADPH. V druhé části cyklu se atomy pěti molekul glycerinaldehyd-3-fosfátu přeskupí tak, že vzniknou tři molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu, jejichž karboxylací celý cyklus začíná. Šestá molekula glycerinaldehyd-3-fosfátu, která je produktem Calvinova cyklu, se využije na syntézu sacharidů, aminokyselin a mastných kyselin (Voet a Voetová, 1995).

2.2 Vliv kadmia na fotosyntézu

Kadmium ovlivňuje jak primární, tak i sekundární fázi fotosyntézy. Těžké kovy mohou přímo inhibovat elektronový transport během primární fáze fotosyntézy, ale i aktivity enzymů Calvinova cyklu nebo asimilaci CO₂ v průběhu sekundární fáze. Předpokládá se, že sekundární fáze fotosyntézy je k působení těžkých kovů citlivější než fáze primární. Kromě přímého působení mohou těžké kovy působit na fotosyntetické procesy nepřímo: mohou indukovat oxidativní stres, narušovat metabolismus vody a minerálů a normální syntézu chlorofylu. Také mohou poškozovat struktury chloroplastů či lipidové a proteinové složky thylakoidů. Existuje několik fotosyntetických parametrů, které umožňují sledovat vliv různých stresorů na fotosyntézu. Patří mezi ně např.: parametry výměny plynů, parametry fluorescence chlorofylu, obsah fotosyntetických pigmentů nebo aktivity enzymů Calvinova cyklu (Burzyński a Żurek, 2007; Burzyński a Kłobus, 2004).

Nejmarkantnějším ukazatelem vlivu kadmia na fotosyntézu je rychlost čisté fotosyntézy (P_N) (Burzyński a Żurek, 2007; Burzyński a Kłobus, 2004; Dong a kol., 2005). P_N je definována jako množství spotřebovaného CO₂ nebo uvolněného O₂ vztažené na jednotkovou

plochu listu a na jednotku času (Pavlová, 2005). Již dříve bylo zjištěno, že kadmium výrazně snižuje P_N u různých rostlinných druhů. Při těchto experimentech byly rostliny vystaveny koncentracím kadmia v rozsahu 56 až 112 mg/l. Bylo zjištěno, že v brzkém stádiu vývoje, u 30 dní starých rostlin, došlo k potlačení P_N o 50 %, zatímco v pozdější fázi vývoje, u 70 dní starých rostlin, nemělo kadmium na P_N výrazný vliv. Koncentrace kadmia, které byly použity v těchto experimentech jsou poměrně vysoké a rostliny se s nimi běžně v přírodě nesetkají. Dong a kol. (1995) zkoumaly působení kadmia o různých koncentracích (0,1; 1; 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$) na dvě odrůdy rajčat. Jejich výsledky ukazují, že P_N klesá téměř lineárně se zvyšující se koncentrací kadmia u obou odrůd rajčete (viz obr. 2). Pozorované snížení P_N může být částečně připsáno nižšímu obsahu chlorofylu, který autoři při experimentu také pozorovali. Naproti tomu intracelulární koncentrace CO_2 (C_i) rostla se zvyšující se koncentrací kadmia (viz obr. 2) (Dong a kol., 2005). Výrazné snížení P_N bylo prokázáno i v dalších pracích. Například působením kadmia o koncentraci 20 μM klesla P_N v listech okurky na 80 % a při koncentraci 50 μM dokonce na 20 % ve srovnání s kontrolou. Přitom výrazné snížení P_N nebylo způsobeno nízkou koncentrací CO_2 v chloroplastech, neboť hodnoty C_i byly, i v této práci, vyšší u rostlin stresovaných kadmiiem ve srovnání s kontrolními rostlinami. Zvýšenou hodnotu C_i lze přisoudit nízké P_N a nebo zvýšené rychlosti respirace, která byla často zaznamenána u rostlin po působení těžkých kovů. Tyto výsledky také naznačují, že drastické snížení P_N nebylo způsobeno přímým vlivem kadmia na uzavírání průduchů (Burzyński a Kłobus, 2004).



Obr. 2: Vliv kadmia na rychlost čisté fotosyntézy (P_N) a intracelulární koncentraci CO_2 (C_i). Upraveno podle Dong a kol. (2005). Hezuo 903 a Jiangshu 14 značí jednotlivé odrůdy rajčete.

Vliv kadmia na fotosyntetickou fixaci CO₂ byl sledován měřením aktivit dvou enzymů zapojených do reakcí Calvinova cyklu: 3-fosfoglycerátkinasy (PGK) a glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPDH). Enzymové aktivity byly stanoveny spektrofotometricky při 340 nm pomocí spřažených reakcí s NADPH. Bylo zjištěno, že v určitém rozsahu kadmium snižuje aktivitu obou enzymů, aktivita PGK byla snížena výrazněji. Kadmium pravděpodobně nesnižuje pouze aktivitu sledovaných enzymů, ale může inhibovat i jejich syntézu (Burzyński a Žurek, 2007). Zpomalení redukce CO₂ během fotosyntézy může mít vliv na fotochemickou účinnost fotosyntézy, protože dojde k porušení rovnováhy mezi energií absorbovaných fotonů a energií využitou při metabolismu uhlíku. Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že fotosyntetická redukce CO₂ je k působení těžkých kovů citlivější, než elektronový transport v primární fázi fotosyntézy (Burzyński a Kłobus, 2004).

3. KADMIUM A FOTOSYNTETICKÉ PIGMENTY

3.1 Rostlinné pigmenty

V rostlinách je obsaženo mnoho různých látek, které mají schopnost absorbovat sluneční záření. Látky které absorbují záření ve viditelné oblasti spektra, se člověku jeví jako barevné a jsou označovány jako barviva neboli pigmenty. Společným znakem těchto látek je přítomnost většího počtu konjugovaných dvojných vazeb v molekule. Chemicky i funkčně se jedná o velmi heterogenní skupinu látek (Pavlová, 2005). Rostlinné fotosyntetické pigmenty lze rozdělit do tří kategorií na: chlorofyly (porfyriny), fykobiliny (lineární tetrapyroly) a karotenoidy (isoprenoidy). Nejdůležitějšími fotosyntetickými pigmenty jsou chlorofyly, ostatní rostlinné pigmenty mají pouze pomocnou funkci: zachycují kvanta dopadajícího záření a energii svého excitovaného stavu přenášejí na chlorofyl *a* v reakčním centru (Sofrová a kol., 2005).

3.1.1 Chlorofyly

Základní strukturu chlorofylů tvoří cyklický tetrapyrol - porfyrin. V centru porfyrinového kruhu je vázán atom hořčíku. V porfyrinovém kruhu jsou konjugované dvojně vazby, jejichž π -elektrony jsou důležité pro absorpci fotonů. Jednotlivá pyrolová jádra porfyrinového kruhu se značí římskými číslicemi I až IV. Na pyrolové jádro IV je navázán zbytek alkoholu fytolu, který je hydrofobní a umožňuje zakotvení molekuly chlorofylu v membráně thylakoidu. Struktura chlorofylů je zobrazena na obr. 3 na str. 12.

v absorpci energie pro fotosyntézu, ale mají také důležitou ochrannou roli. Pokud na rostlinu dopadá daleko více energie než je fotosyntetický aparát schopen využít, začíná fungovat tzv. xanthofylový cyklus, díky kterému se zabrání poškození rostliny zářením. V xanthofylovém cyklu je violaxanthin přeměněn přes anteraxanthin na zeaxanthin. Zeaxanthin má schopnost přeměnit nadbytek energie na teplo (Pavlová, 2005). Karotenoidy fungují rovněž jako antioxidační činidla, protože jsou schopny vázat tzv. reaktivní formy kyslíku (Sofrová a kol., 2005).

3.2 Vliv kadmia na obsah fotosyntetických pigmentů

Bylo zjištěno, že kadmium má negativní dopad na obsah chlorofylu v závislosti na dvou důležitých faktorech: na koncentraci kadmia a na době, po kterou na rostlinu působí (Dai a kol., 2006; Sanità di Toppi a kol., 2006; Ouzounidou a kol., 1997). Vliv kadmia na obsah chlorofylu byl zkoumán např. u lišejníku *Xanthoria parietina*. Pro ilustraci, v této práci byly použity koncentrace kadmia 4,5; 9; 18 a 36 μM , rostliny byly vystaveny působení kadmia po dobu 24 nebo 48 hodin. Pokud kadmium působilo na rostliny 24 hodin, byl zaznamenán významný pokles množství chlorofylu *a* i celkového chlorofylu (chlorofyl *a* + chlorofyl *b*) pouze při koncentraci 36 μM , zatímco po 48 hodinách pokleslo množství chlorofylu *a* i celkového chlorofylu i při koncentracích 9 a 18 μM . Po přepočítání na procenta bylo zjištěno, že po 24 hodinách působení nejvyšší koncentrace kadmia pokleslo množství chlorofylu *a* o 30 %, zatímco množství chlorofylu *b* se snížilo pouze o 12 %, poklesl i poměr chlorofyl *a* / chlorofyl *b* o 25 % (Sanità di Toppi a kol., 2006).

Chettri a kol. (1998) sledovali působení mědi na obsah chlorofylu lišejníků *Cladonia convoluta* a *Cladonia rangiformis*. Došli k závěru, že po působení mědi značně poklesl obsah chlorofylu *a*, zatímco množství celkového chlorofylu se téměř nezměnilo. Chlorofyl *a* se působením mědi částečně přeměnil na chlorofyl *b* oxidací methylové skupiny na cyklu II (Chettri a kol., 1998). Jak je uvedeno výše, přeměna chlorofylu *a* na chlorofyl *b* nebyla v případě kadmia pozorována, neboť snížení obsahu chlorofylu *a* bylo spojeno se snížením obsahu celkového chlorofylu.

Vzhledem k tomu, že se ve výše uvedené práci snížilo celkové množství chlorofylu, snažili se autoři zjistit, zda je atom hořčíku v molekule chlorofylu nahrazen kadmíem. Feofytinizační koeficient (PHQ) odráží nahrazení atomu hořčíku v molekule chlorofylu jiným kovem. Hodnoty PHQ u rostlin, na které působilo kadmium, byly shodné s hodnotami naměřenými v kontrole. Pozorované snížení obsahu chlorofylu tedy nebylo způsobeno nahrazením atomu hořčíku v molekule chlorofylu kadmíem, ale kadmium pravděpodobně

ovlivnilo některý krok biosyntézy chlorofylu (Sanità di Toppi a kol., 2006).

Biosyntéza chlorofylu vychází z kyseliny glutamové, která je za přítomnosti ATP, Mg^{2+} a katalýzy specifickou ligasou navázána na tRNA. Ve formě glutamyl-tRNA může být kyselina glutamová použita pro syntézu pyrolů. V dalším kroku je glutamyl-tRNA redukován na glutamát-1-semialdehyd, který je bezprostředním prekurzorem kyseliny 5-aminolevulové (5-ALA). Další reakci katalyzuje enzym 5-ALA dehydrogenasa, při této reakci kondenzují dvě molekuly 5-ALA za vzniku porfobilinogenu (PBG), který má již konstituované pyrolové jádro. Následuje krok, při kterém kondenzují 4 molekuly PBG za vzniku uroporphyrinogenu, který obsahuje čtyři pyrolová jádra spojená do kruhu čtyřmi methinovými skupinami. Úpravami postranních řetězců vzniká protoporphyrin IX. Enzym Mg-chelatasa zabuduje do centra tetrapyrolového kruhu atom hořčíku. Touto reakcí vzniká Mg-protoporphyrin, biosyntéza chlorofylu pokračuje úpravami postranních řetězců Mg-protoporphyrinu za vzniku protochlorofylidu *a*. Ten je enzymem protochlorofylidoxidoreduktasou (POR) redukován na chlorofylid *a*, který je bezprostředním prekurzorem chlorofylu *a*. Po navázání fytolu vzniká chlorofyl *a*, chlorofyl *b* vzniká oxidací chlorofylu *a* (Pavlová, 2005). Bylo prokázáno, že kadmium inhibuje biosyntézu chlorofylu snížením aktivit enzymu POR u ječmene a kukuřice (Ouzounidou a kol., 1997), také inhibuje enzym ALA-dehydrogenasu (Dai a kol., 2006).

V dalších studiích na řepce olejce pěstované s kadmiiem byl rovněž pozorován úbytek chlorofylu. V tomto případě nebyla zaznamenána porucha aktivity žádného enzymu biosyntézy chlorofylu, ani změny v absorpčním spektru chlorofylu, které by naznačovaly substituci atomu hořčíku v molekule chlorofylu nějakou jinou látkou. Snížení obsahu chlorofylu autoři připisují tomu, že kadmium brání rozmnožování chloroplastů. V jednotlivých chloroplastech bylo množství chlorofylu shodné s kontrolou, ale chloroplastů výrazně ubylo, čímž i celkové množství chlorofylu bylo nižší (Baryla a kol., 2000).

V listech okurky byl sledován obsah železa a bylo zjištěno, že pod vlivem kadmia došlo k snížení jeho obsahu. Čím vyšší byla koncentrace kadmia, tím více se obsah železa v listech okurky snížil. Kadmium, stejně jako jiné těžké kovy, způsobuje pokles příjmu vody a živin. Může tedy inhibovat biosyntézu chlorofylu také tím, že brání transportu železa, které je pro tvorbu chlorofylu nezbytné (Burzyński M., Klobus G., 2004).

Dalšími významnými rostlinnými pigmenty jsou karotenoidy. Po působení kadmia byl rovněž pozorován úbytek karotenoidů u *Azolla imbricata*. Jak jsem uvedla v kapitole 3.1.2, karotenoidy hrají důležitou roli při ochraně chlorofylu a chloroplastů před fotooxidačním poškozením. V této souvislosti lze předpokládat, že snížení obsahu karotenoidů může mít za následek poškození chlorofylu při působení kadmia (Dai a kol., 2006).

4. JAK SE ROSTLINY PŮSOBENÍ KADMIA BRÁNÍ

Rostliny nemají možnost aktivního pohybu a úniku z prostředí, ve kterém rostou. V průběhu života jsou vystavovány působení mnoha stresových faktorů z vnějšího prostředí a ocitají se ve stresu. Na změnu podmínek prostředí reagují rostliny zapojením obranných mechanismů (Procházka a kol., 1998). Pokud jsou rostliny vystaveny působení kadmia (ale i jiných těžkých kovů), zahájí syntézu thiolových sloučenin: glutathionu a fytochelatinů. Glutathion je tripeptid skládající se z glutaminu, cysteinu a glycinu (γ -glutamylcysteinylglycin). Glutathion se v organismu vyskytuje ve dvou formách: oxidované a redukované. Z redukované formy glutathionu transpeptidační reakcí vzniká fytochelatin, reakci katalyzuje enzym γ -glutamyl-cysteindipeptidtranspeptidasa. Základní strukturu fytochelatinů tvoří: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, kde $n= 2\text{--}11$. Fytochelatiny tvoří s kadmíem komplexy, ve kterých je kadmium vázáno přes síru. Cheláty se tvoří v cytosolu, fytochelatiny s navázaným kadmíem se hromadí ve vakuole, kde je komplex kadmium-fytochelatin stabilizován sulfidovými ionty (Clemens, 2000; Hall, 2001).

Dalším významným obranným mechanismem je tvorba stresových proteinů. Proteiny teplotního šoku (HSP z anglického *heat shock proteins*) se tvoří jak u rostlin tak u živočichů jako odpověď na zvýšení teploty nad teplotní optimum ideální k růstu. HPS jsou klasifikovány podle molekulové hmotnosti a tvoří se mimo výše uvedeného pod vlivem mnoha stresových situací včetně působení těžkých kovů. Kadmium vyvolává syntézu HPS o velikosti 70 kDa (pozorováno např. u rýže nebo kukuřice). HPS70 byly nalezeny v jádře, cytosolu, ale také v plazmatické membráně, což naznačuje, že HPS70 se zapojují do ochrany membrán před poškozením kadmíem (Hall, 2001). Ukázalo se, že HPS70 jsou fosfoproteiny a fungují jako chaperony, omezují poškození a opravují poškozené proteiny (Prasad, 1995). Také byly objeveny tzv. malé proteiny teplotního šoku o velikosti 17 kDa, které se podílejí na ochraně buněčných struktur před působením těžkých kovů (Hall, 2001).

5. CÍL PRÁCE

- Shrnout dosud známé poznatky o vlivu kadmia na fotosyntézu, a to především na obsah chlorofylu.
- Separovat rostlinné pigmenty vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a sledovat, jak kadmium ovlivňuje množství chlorofylu (vázaného v thylakoidní membráně nebo rozpuštěného v methanolovém extraktu) a zda je chlorofyl případně konvertován na feofytin.

PRAKTICKÁ ČÁST

6. MATERIÁL A METODY

6.1 Použité přístroje

- Centrifuga MPW-300, výrobce: Mechanika Precyzyjna, Polsko
- Sestava pro HPLC, výrobce: ECOMAC spol. s.r.o.
- Spektrofotometr Helios α , výrobce: Thermo Spectronic

6.1.1 Sestava pro HPLC

Součásti kapalinového chromatografu jsou vyjmenovány a popsány v tabulce 1.

Tabulka 1: Součásti kapalinového chromatografu.

Součást	Doplňující informace
Zásobník mobilní fáze	Zásobník mobilní fáze LCT 02
Čerpadlo	Čerpadlo BETA 10
Odplyňovač	Vakuový odplyňovač DG 3014
Dávkovací zařízení	Ventil D dávkovací analytický smyčkový, Smyčka vnější 100 μ l, nerez
Kolona	Kromasil 100, C18, zrnitost 7 μ m, rozměry: 250 \times 4,6 mm
Termostat	Termostat Kolon LCO102 SINGLE
Detektor	UV-vis detektor Sapphire s plynule nastavitelnou vlnovou délkou v rozsahu 190 až 800 nm

6.1.2 Nastavení kapalinového chromatografu

Při všech separacích jsem používala izokratickou kapalinovou chromatografii. Průtok mobilní fáze kolonou byl vždy 1 ml / min, teplota byla vždy 30°C. Vlnovou délku jsem si volila před každým měřením, dle charakteru separovaných látek.

6.1.3 Chromatografický software ECOMAC

Pro sběr dat jsem měla k dispozici chromatografický software ECOMAC, prostřednictvím kterého lze také řídit přístroje (čerpadlo, termostat a detektor). Na monitoru počítače můžeme sledovat např. průtokovou rychlost, zvolenou vlnovou délku, tlak čerpadla nebo teplotu. Po nástřiku vzorku na kolonu se na monitoru zobrazuje chromatogram. Sebraná data lze v tomto programu uložit a následně exportovat a zpracovat. Já jsem pro následné zpracování dat užívala program Microsoft Office Excel 2003.

6.2 Použité chemikálie a rostlinný materiál

použité chemikálie:

- HEPES, výrobce: Sigma, Německo
- hydroxid sodný, výrobce: Lachema, Česká republika
- hexahydrát chloridu hořečnatého, výrobce: Lachema, Česká republika
- chlorid kademnatý, výrobce: Lachema, Česká republika
- kyselina chlorovodíková, výrobce: Lachema, Česká republika
- methanol pro HPLC, výrobce: LAB SCAN, Irsko

použitý rostlinný materiál:

- čerstvé špenátové listy
- thylakoidní membrány ze špenátu

6.3 Přímé působení chloridu kademnatého na chlorofyly v methanolvém extraktu

6.3.1 Příprava extraktu ze špenátových listů

Pro odstranění vody jsem špenátové listy přes noc lyofilizovala. Na analytických vahách jsem odvážila 0,2 g sušeného materiálu. V třecí misce jsem sušené listy rozdrtila tloučkem a přidala jsem 4 ml methanolu pro HPLC. Za občasného promíchání jsem vzorek nechala extrahovat asi 10 minut. Poté jsem extrakt slila a následně centrifugovala na centrifuze MPW-300 po dobu 3 minut. Supernatant jsem ještě přefiltrovala přes mikrofiltr, abych zabránila zanesení kolony.

6.3.2 Separace rostlinných pigmentů pomocí HPLC

Nástřik extraktu do dávkovací smyčky se provádí, je-li páka dávkovače v poloze LOAD. Extrakt jsem nasála do injekční stříkačky a pomocí jehly jsem ho vstříkla do dávkovací smyčky. Otočením páky dávkovače do polohy INJECT jsem vzorek nanasla na kolonu, zároveň jsem spustila záznam chromatogramu v programu ECOMAC. Detekci jsem

prováděla při vlnové délce 438 nm, protože při této vlnové délce je zajištěna vysoká citlivost detekce chlorofylů a karotenoidů.

Na koloně s reverzní fází dochází k separaci rostlinných pigmentů především na základě jejich rozdílné hydrofobicity. Nejprve vytékají polárnější barviva – xantofyly, následují chlorofyly: chlorofyl *b* vytéká dříve než chlorofyl *a*, protože má na jádře II formylovou skupinu, zatímco chlorofyl *a* má na témže místě methyl. Až nakonec vytékají nepolární látky (např. β -karoten). Pro další účely jsem shromáždila obě chlorofylové frakce vytékající z kolony. Podle chromatogramu jsem do mikrozkušavek jímala jednotlivé frakce rostlinných pigmentů vytékajících z kolony. Abych se přesvědčila, že se skutečně jedná o chlorofyly, proměřila jsem na spektrofotometru He λ ios α absorpční spektrum sebraných látek v rozsahu 350–700 nm proti methanolu pro HPLC. Absorpční spektra methanolvých roztoků chlorofylu *a* a chlorofylu *b* zobrazují obr. 6 a 7 na str. 24. O tom že jsem skutečně izolovala chlorofyly svědčila i nazelenalá barva shromážděných frakcí. Z chromatogramu (viz obr. 4 na str. 22) jsem odečetla eluční časy chlorofylů (viz tabulka 5 na str. 22).

6.3.3 Feofytinizace chlorofylu

Feofytin lze připravit okyselením chlorofylu (Eijkelhoff a Dekker, 1995). Ze zásobního roztoku 35 % HCl jsem připravila 0,022M roztok HCl v methanolu (50 μ l 35 % HCl + 21,8 ml methanolu pro HPLC). Z odebrané frakce jsem odpipetovala 1 ml methanolvého roztoku chlorofylu *a* a přidala jsem 50 μ l připraveného roztoku HCl, čímž jsem dosáhla celkové koncentrace HCl v roztoku chlorofylu *a* 0,1 mM. Kyselinu jsem nechala na methanolvý roztok chlorofylu *a* působit asi 10 minut, během této doby jsem pozorovala, že původně zeleně zbarvený methanolvý roztok chlorofylu *a* získal nažloutlou barvu. Následně jsem kyselinu zneutralizovala přidáním ekvivalentního množství 0,022M NaOH v methanolu. Na spektrofotometru He λ ios α jsem proměřila absorpční spektrum vzniklého methanolvého roztoku feofytinu *a* v rozmezí 350–700 nm, viz obr. 6 na str. 24. Jako slepý vzorek jsem použila methanol pro HPLC. Stejně jsem postupovala i s methanolvým roztokem chlorofylu *b*, absorpční spektrum methanolvého roztoku feofytinu *b* viz obr. 7 na str. 24.

6.3.4 Určení elučních časů feofytinů

Ze spekter na obr. 6 a 7 jsem určila nejvhodnější vlnovou délku pro detekci feofytinů při HPLC. Jako nejvhodnější vlnovou délku jsem zvolila 418 nm, kde oba feofytiny dosahují absorpčního maxima v levém vrcholu. Vzorky (feofytin *a*, feofytin *b*) jsem postupně nanasla na kolonu a z chromatogramů (viz obr. 5 na str. 23) jsem odečetla jejich eluční časy, viz

tabulka 5 na str. 22.

6.3.5 Inkubace chlorofylu s kadmíem

Nejprve jsem si připravila 0,025M roztok CdCl_2 v methanolu: k odváženému množství 0,1145 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ jsem přidala 20 ml methanolu pro HPLC. $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ se v methanolu velmi špatně rozpouští, při rozpouštění bylo třeba intenzivně míchat.

Stejným způsobem jako v bodě 6.3.2 jsem jímala další chlorofylové frakce. Frakci methanolového roztoku chlorofylu *a* jsem rozdělila do dvou mikrozkušavek po 0,5 ml. Do první mikrozkušavky jsem přidala 0,5 ml methanolu pro HPLC, tento vzorek posloužil jako kontrola. Do druhé mikrozkušavky jsem přidala 0,5 ml 0,025M roztoku CdCl_2 v methanolu. Stejně jsem postupovala i s methanolovým roztokem chlorofylu *b*. Všechny vzorky jsem umístila do lednice, kde jsem methanolové roztoky chlorofylů inkubovala s CdCl_2 . Po 45 minutách jsem proměřila absorpční spektra všech vzorků v rozmezí 350–700 nm, viz obr. 10 a obr. 11 na str. 27. Všechny vzorky jsem proměřila při dvou vlnových délkách: 418 a 655 nm. Chromatogramy kontrolních vzorků a vzorků inkubovaných s kadmíem viz obr. 8 a obr. 9 na str. 25 a 26.

6.4 Působení chloridu kademnatého na chlorofyly v thylakoidních membránách

Podle tabulky 2 jsem připravila roztoky CdCl_2 v MH pufru.

Tabulka 2: Navážky $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ pro přípravu roztoků.

koncentrace CdCl_2 / M	hmotnost $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ / g	objem MH pufru / ml
0,1	0,2283	10
0,225	0,5138	10

Příslušná množství $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ jsem odvážila na analytických vahách a rozpustila v 10 ml MH pufru. Složení MH pufru viz tabulka 3.

Tabulka 3: Složení MH pufru.

složka	koncentrace / mM	hmotnost / g	pH	celkový objem / ml
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5	0,4766	6,5	100
HEPES	20	0,1017		

Thylakoidní membrány ze špenátu jsem měla k dispozici již izolované, koncentrace chlorofylu byla 1,12 mg /ml. Připravila jsem si tři vzorky thylakoidních membrán po 200 μ l. Thylakoidní membrány jsem odstředila na centrifuze MPW-300 po dobu 3 minut, supernatant jsem odstranila a dále jsem pracovala s peletem. Pelet jsem resuspendovala v MH pufru (resp. MH pufru s CdCl_2) v množství odpovídajícím hmotnosti odstraněného supernatantu, viz tabulka 4.

Tabulka 4: Koncentrace chloridu kadmnatého v thylakoidních membránách.

číslo	objem thylakoidních membrán / μl	objem MH pufru (resp. MH pufru s CdCl_2) / μl	koncentrace CdCl_2 / M
1	200	189	0
2	200	186	0,1
3	200	181	0,225

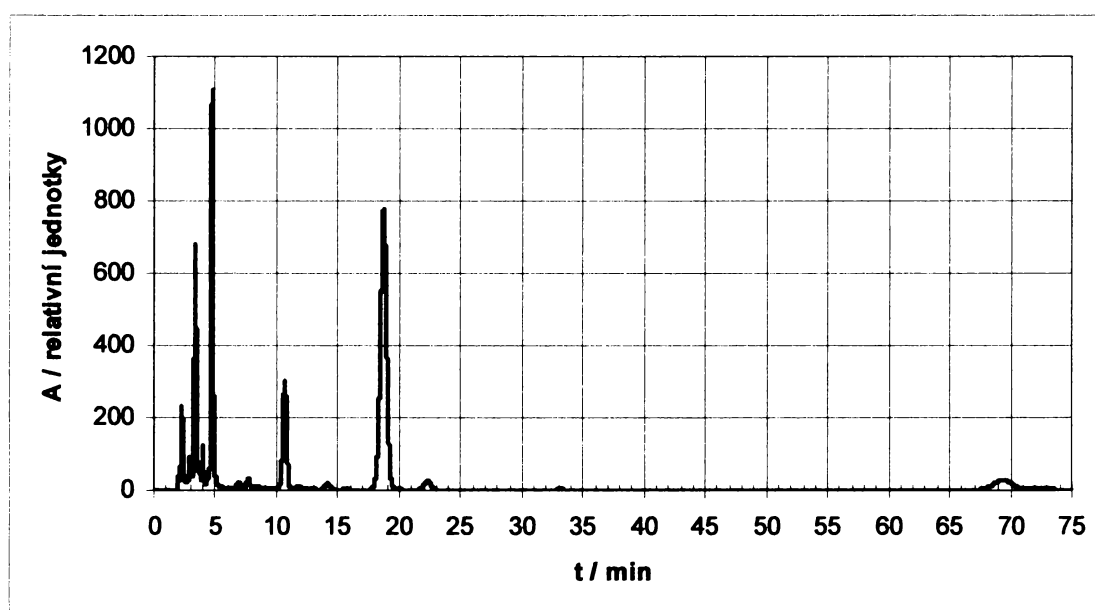
Membrány jsem s kadmíem inkubovala 45 minut v lednici. Poté jsem je opět odstředila na centrifuze po dobu 3 minut a promyla MH pufrém. Pelet jsem přes noc lyofilizovala. Lyofilizovaný pelet jsem rozpustila v 600 μ l methanolu pro HPLC. Asi po 10 minutách extrakce jsem roztok opět odstředila. Supernatant jsem přefiltrovala přes mikrofiltr a nanasla na kolonu.

Chromatogramy uvedených vzorků jsem zpracovala do společného grafu na obr. 12 na str. 28. U všech tří vzorků jsem také proměřila absorpční spektra v rozsahu 350–700 nm proti methanolu pro HPLC, viz obr. 13 na str. 29.

7. VÝSLEDKY

7.1 Chromatogramy a absorpční spektra chlorofylů a feofytinů

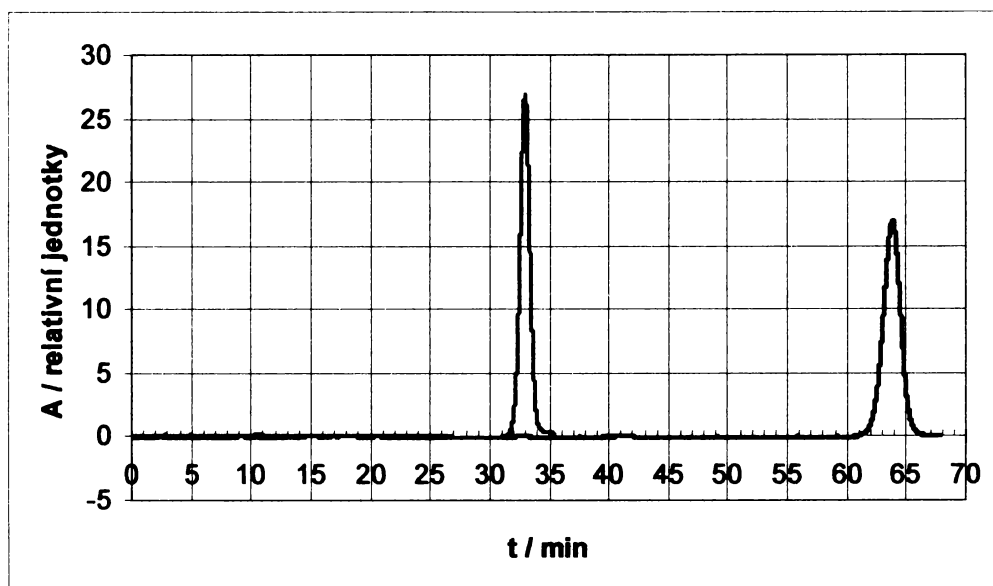
Postupem popsaným v kapitole 6.3.2 jsem separovala rostlinné pigmenty v methanolovém extraktu ze sušených špenátových listů. Výsledky jsem graficky zpracovala a získala chromatogramy a absorpční spektra. Z chromatogramu na obr. 4 jsem odečetla eluční časy chlorofylu *a* a chlorofylu *b* a uvedla v tabulce 5. Chromatogramy okyseleného chlorofylu *a* (feofytin *a*) a okyseleného chlorofylu *b* (feofytin *b*) jsem zpracovala do společného grafu na obrázku 5. Z chromatogramů jsem odečetla eluční časy feofytinů (viz tabulka 5).



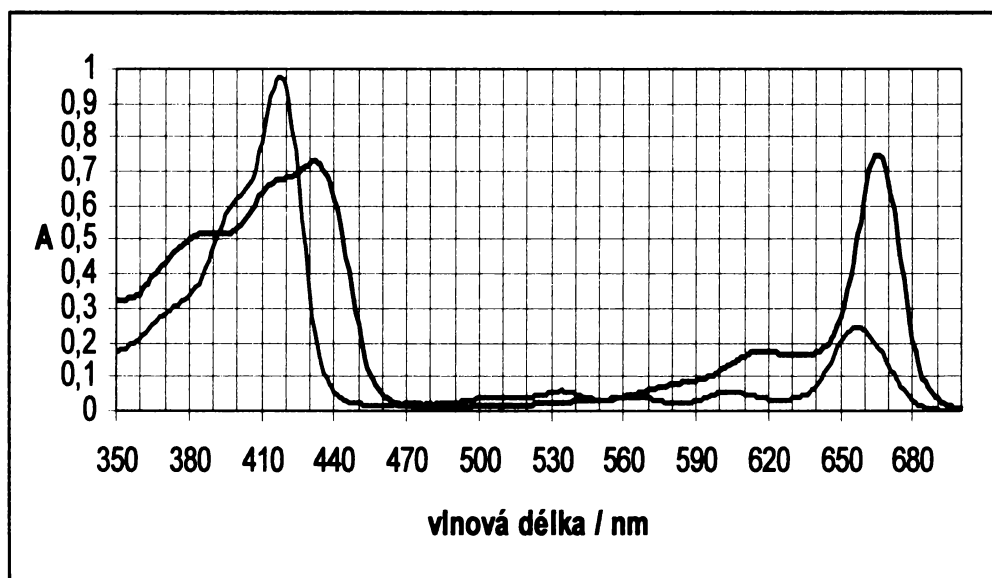
Obr. 4: Chromatogram methanolového extraktu ze sušených špenátových listů. Chromatogram byl zaznamenán při vlnové délce 438 nm.

Tabulka 5: Eluční časy chlorofylů a feofytinů.

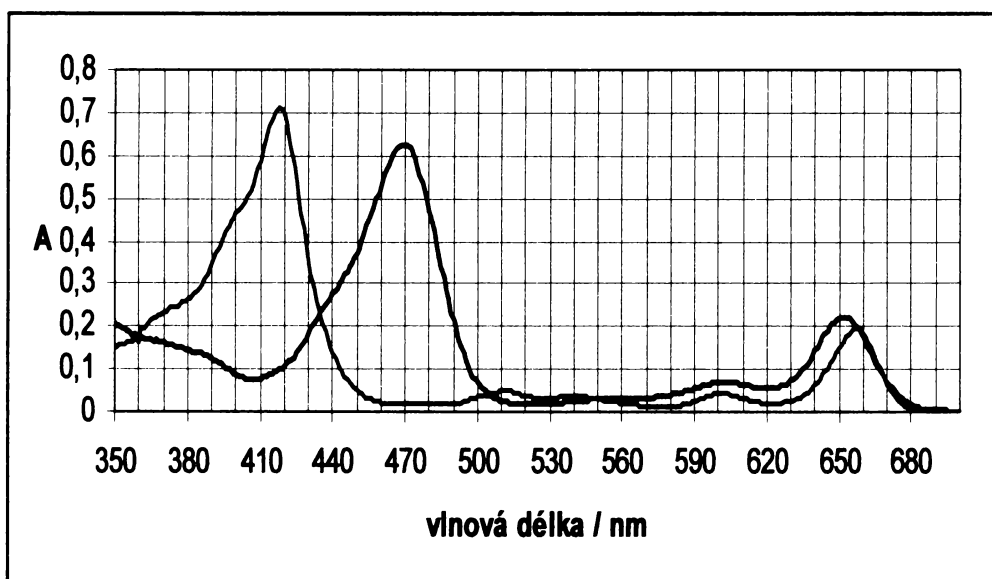
pigment	eluční čas / min
chlorofyl <i>a</i>	18,3
chlorofyl <i>b</i>	10,4
feofytin <i>a</i>	63,9
feofytin <i>b</i>	33,0



Obr. 5: Chromatogramy: methanolvý roztok feofytinu *a* (modrá), methanolvý roztok feofytinu *b* (růžová). Chromatogramy byly zaznamenány při vlnové délce 418 nm.



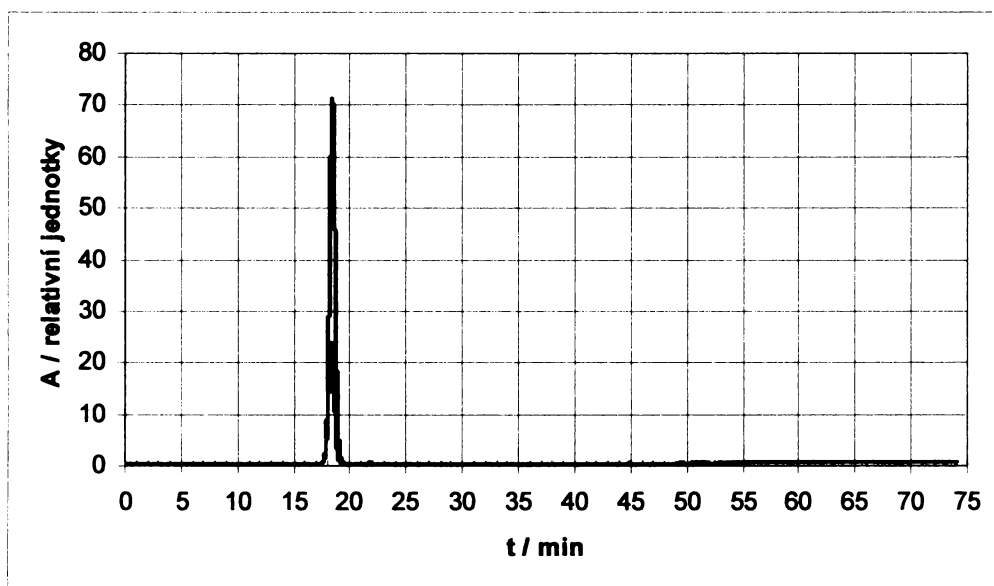
Obr. 6: Absorpční spektrum methanolového roztoku chlorofylu *a* (modrá), absorpční spektrum methanolového roztoku feofytinu *a* (růžová). Obě křivky odpovídají stejné koncentraci daného pigmentu. Absorpční spektra byla proměřena v rozsahu 350–700 nm. Hlavní absorpční maxima: modrá křivka – pravý vrchol (665 nm), levý vrchol (432 nm), růžová křivka – pravý vrchol (656 nm), levý vrchol (418 nm).



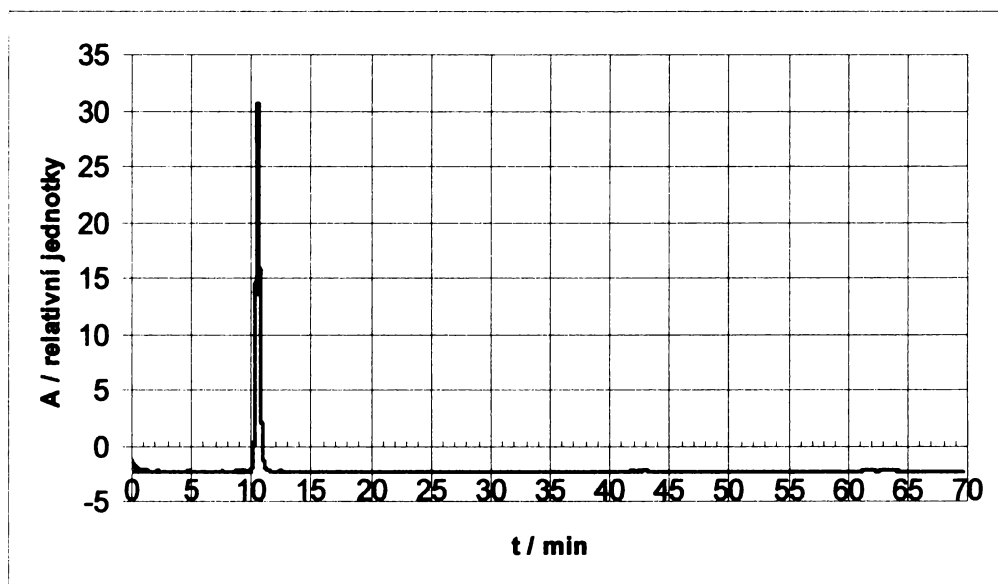
Obr. 7: Absorpční spektrum methanolového roztoku chlorofylu *b* (modrá), absorpční spektrum methanolového roztoku feofytinu *b* (růžová). Obě křivky odpovídají stejné koncentraci daného pigmentu. Absorpční spektra byla proměřena v rozsahu 350–700 nm. Hlavní absorpční maxima: modrá křivka – pravý vrchol (652 nm), levý vrchol (469,5 nm), růžová křivka – pravý vrchol (656 nm), levý vrchol (418 nm).

7.2 Přímé působení chloridu kademnatého na chlorofyly v methanolovém extraktu

Výsledky popsané v této kapitole byly získány postupy uvedenými v kapitole 6.3.5. Grafy na obrázcích 8 a 9 zobrazují chromatogramy, grafy na obrázcích 10 a 11 zobrazují absorpční spektra před a po inkubaci methanolových roztoků chlorofylu *a* a chlorofylu *b* s 0,025M roztokem chloridu kademnatého. S užitím programu PeakFit (verze 4.12) jsem určila plochy jednotlivých píků na obrázcích 8 a 9. Následně jsem vypočítala procentuální úbytek chlorofylu *a* a chlorofylu *b* po inkubaci s 0,025M roztokem chloridu kademnatého (viz tabulka 6).



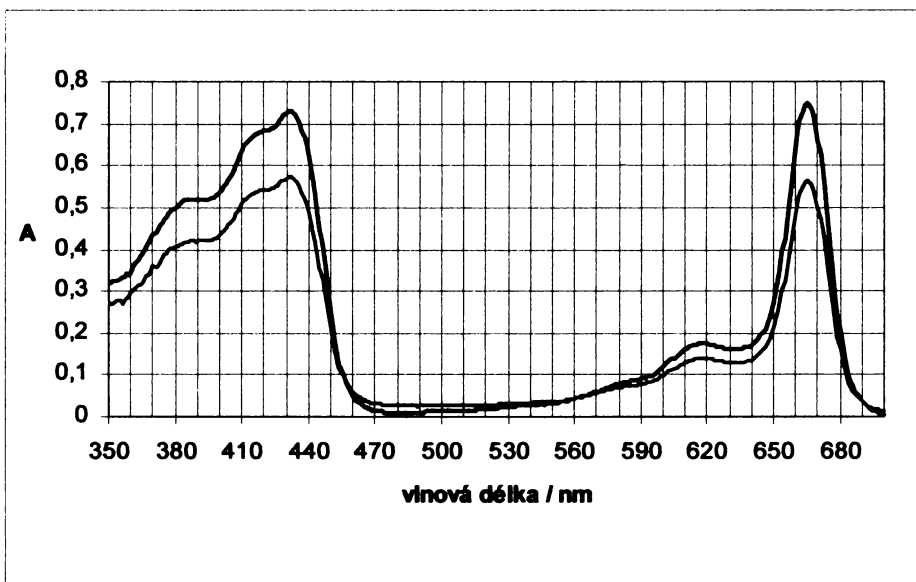
Obr. 8: Chromatogram: methanolový roztok chlorofylu *a* (modrá), methanolový roztok chlorofylu *a* po inkubaci s 0,025M CdCl_2 (růžová). Chromatogram byl zaznamenán při vlnové délce 655 nm.



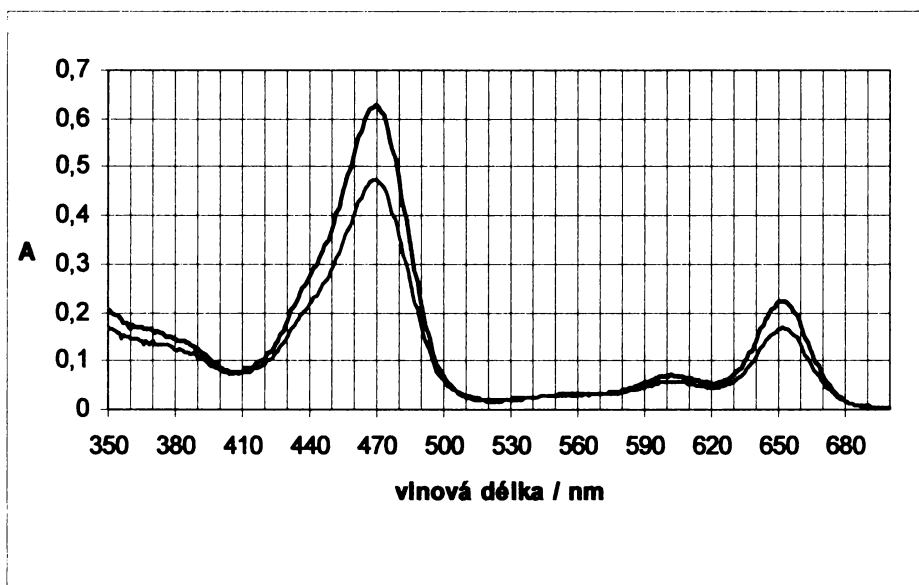
Obr. 9: Chromatogram: methanolvý roztok chlorofylu *b* (modrá), methanolvý roztok chlorofylu *b* po inkubaci s 0,025M CdCl₂ (růžová). Chromatogram byl zaznamenán při vlnové délce 655 nm.

Tabulka 6: Plochy píků a změny množství chlorofylu *a* a chlorofylu *b*.

pigment	plocha píku / relativní jednotky	rozdíl / %
chlorofyl <i>a</i>	42,140	69
chlorofyl <i>a</i> po inkubaci s CdCl ₂	13,717	
chlorofyl <i>b</i>	13,017	5
chlorofyl <i>b</i> po inkubaci s CdCl ₂	12,384	



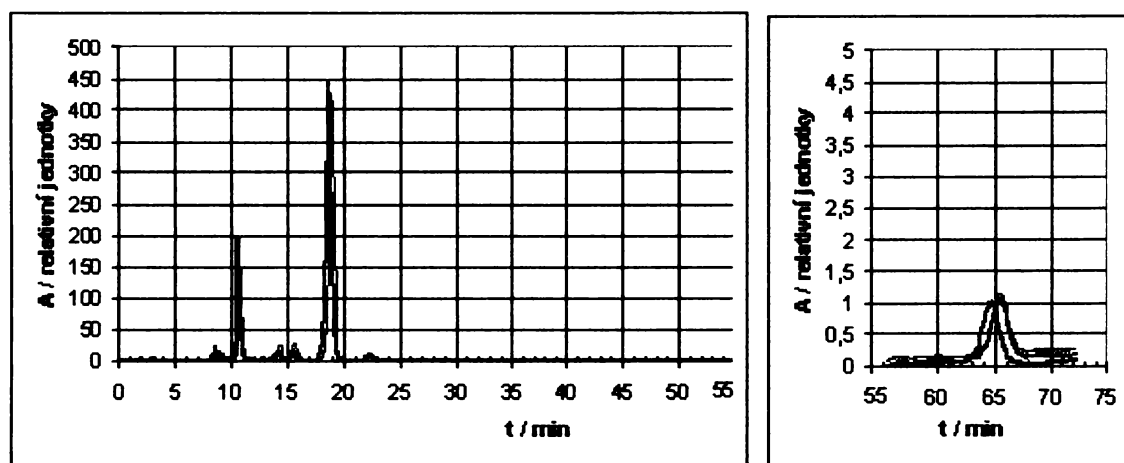
Obr. 10: Absorpční spektrum methanolového roztoku chlorofylu *a* (modrá), absorpční spektrum methanolového roztoku chlorofylu *a* po inkubaci s 0,025M CdCl₂ (růžová). Absorpční spektra byla proměřena v rozsahu 350–700 nm. Hlavní absorpční maxima: modrá křivka – pravý vrchol (665 nm), levý vrchol (432 nm), růžová křivka – pravý vrchol (665) nm, levý vrchol (431,5 nm).



Obr. 11: Absorpční spektrum methanolového roztoku chlorofylu *b* (modrá), absorpční spektrum methanolového roztoku chlorofylu *b* po inkubaci s 0,025M CdCl₂ (růžová). Absorpční spektra byla proměřena v rozsahu 350–700 nm. Hlavní absorpční maxima: modrá křivka – pravý vrchol (652 nm), levý vrchol (469,5 nm), růžová křivka – pravý vrchol (652) nm, levý vrchol (469 nm).

7.3 Působení chloridu kadmnatého na chlorofyly v thylakoidní membráně

Výsledky popsané v této kapitole byly získány postupy uvedenými v kapitole 6.4. Grafy na obrázcích 12 a 13 zobrazují chromatogramy a absorpční spektra methanolového extraktu thylakoidních membrán inkubovaných s různou koncentrací kadmnatých iontů ve srovnání s kontrolou. Pomocí programu PeakFit (verze 4.12) jsem určila plochy píků chlorofylu *a* a chlorofylu *b* v chromatogramu na obr. 12 a vypočítala jsem jak se změnilo množství obou chlorofylů po inkubaci s chloridem kadmnatým, viz. tabulky 7a a 7b.



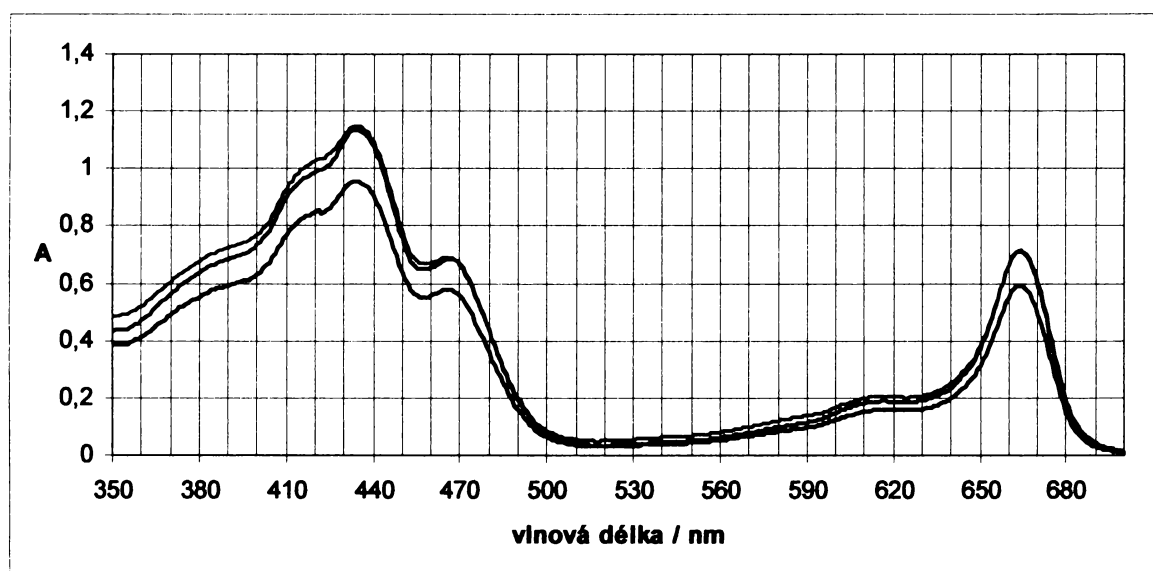
Obr.12: Chromatogram: methanolový extrakt thylakoidních membrán inkubovaných s 0M CdCl₂ (modrá), 0,1M CdCl₂ (růžová) a 0,225M CdCl₂ (zelená). Chromatogram byl zaznamenán při vlnové délce 655nm. Chromatogram je rozdělen do dvou částí z důvodu změny měřítka na ose absorbance.

Tabulka 7a: Plochy píků a změny množství chlorofylu *a*.

koncentrace CdCl ₂ v thylakoidní membráně / M	plocha píku Chla / relativní jednotky	nárůst množství Chla ve srovnání s kontrolou / %
0 (kontrola)	230,64	-
0,100	234,34	1,5
0,225	241,75	5,0

Tabulka 7b: Plochy píků a změny množství chlorofylu *b*.

koncentrace CdCl ₂ v thylakoidní membráně / M	plocha píku Chl <i>b</i> / relativní jednotky	nárůst množství Chl <i>b</i> ve srovnání s kontrolou / %
0 (kontrola)	93,25	-
0,100	98,05	5
0,225	104,71	12



Obr. 13: Absorpční spektrum methanolového extraktu thylakoidních membrán inkubovaných s 0M CdCl₂ (modrá), 0,1M CdCl₂ (růžová) a 0,225M CdCl₂ (zelená). Absorpční spektra byla proměřena v rozsahu 350–700 nm. Hlavní absorpční maxima: modrá křivka – pravý vrchol (663 nm), levý vrchol (433,5 nm), růžová křivka – pravý vrchol (664 nm), levý vrchol (434 nm), zelená křivka – pravý vrchol (663,5 nm), levý vrchol (434 nm).

8. DISKUSE

Ve své bakalářské práci jsem se snažila za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spektrofotometrie zjistit, jak kadmium ovlivňuje množství chlorofylu (vázaného v thylakoidní membráně nebo rozpuštěného v methanolovém extraktu) a zda se chlorofyl působením kadmia přeměňuje na feofytin. Na obrázku 6 na str. 24 je vidět posun od absorpčního spektra chlorofylu *a* k absorpčnímu spektru feofytinu *a*. Pravý i levý vrchol se v absorpčním spektru posouvá směrem doleva, absorbance levého vrcholu narůstá zatímco v pravém vrcholu mírně klesá. Na obrázku 7 na str. 24 je vidět přechod od absorpčního spektra chlorofylu *b* k absorpčnímu spektru feofytinu *b*. V tomto případě se také levý vrchol posouvá vlevo, zatímco pravý mírně vpravo, změny absorbance zde nejsou tak patrné.

Pokud jsem chlorid kademnatý (o koncentraci 0,025M) přidala přímo k methanolovému extraktu chlorofylů, pozorovala jsem úbytek chlorofylu *a* i chlorofylu *b*. Z obrázků 8 a 9 na str. 25 a 26 je patrné, že úbytek chlorofylu *a* byl mnohem výraznější. Množství chlorofylu *a* pokleslo o 69 %, zatímco množství chlorofylu *b* pouze o 5 %. K podobnému zjištění dospěli i Sanità di Toppi a kol. (2006), když kadmium (o koncentraci 0,036M) nechali působit na lišejník *Xanthoria parietina*. Při stejné koncentraci kadmia pozorovali pokles množství chlorofylu *a* o 30 % zatímco množství chlorofylu *b* se snížilo o 12 %.

Z obrázků 8 a 9 je také zřejmé, že po působení kadmia se v elučních časech feofytinů neobjevil žádný pík. Z toho usuzuji, že kadmium nezpůsobuje přeměnu chlorofylu na feofytin. V tomto názoru mě utvrzuje i tvar absorpčních spekter na obrázcích 10 a 11 na str. 27, kde také nepozoruji posun od absorpčních spekter chlorofylů k absorpčním spektrům feofytinů. Tyto výsledky jsou v rozporu se závěry, které zjistila ve své bakalářské práci Anna Fendrychová. Fendrychová (2007) spektrofotometricky sledovala vliv kademnatých iontů na chlorofyl *a* sinice *Synechococcus elongatus*. Při koncentraci kadmia 0,025M zaznamenala ve spektrech téměř úplnou feofytinizaci chlorofylu. Já jsem při přípravě vzorků postupovala stejně jako Fendrychová s tím rozdílem, že jsem pracovala s lyofilizovaným rostlinným materiálem a nikoli s vodnými suspenzemi. V dalších experimentech je třeba ověřit, zda příměs vody v methanolu může usnadnit feofytinizaci chlorofylu v přítomnosti kadmia.

Existuje několik prací, které se zabývají vlivem kadmia na obsah chlorofylu (Sanità di Toppi a kol., 2006; Ouzounidou a kol., 1997; Dai a kol., 2006; Baryla a kol., 2000), ve většině případů jsou pozorovány účinky kadmia na živé rostliny. V části prací (Sanità di Toppi a kol., 2006; Ouzounidou a kol., 1997; Dai a kol., 2006) je snížení množství chlorofylu vysvětleno

narušením některého kroku biosyntézy chlorofylu, případně tím, že kadmium brání rozmnožování chloroplastů, což vede k snížení množství chlorofylu ve srovnání s kontrolou, i přesto že v jednotlivých chloroplastech zůstává koncentrace chlorofylu stejná (Baryla a kol., 2000).

Feofytinizace chlorofylu byla zaznamenána v přítomnosti niklu a chromu. Působením nikelnatých iontů (o koncentraci 10^{-3} M) v buňkách *Euglena gracilis* téměř všechen existující chlorofyl degradoval a konvertoval na feofytin. Předpokládá se, že feofytinizaci vyvolal posun pH do kyselé oblasti uvnitř buněk způsobený změnou propustnosti buněčné membrány nikelnatými ionty (Manankina a kol., 2003). Rovněž ionty Cr^{6+} u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* o koncentraci větší nebo rovné $10 \mu\text{M}$ způsobily téměř úplnou přeměnu chlorofylu na feofytin (Rodríguez a kol., 2007). V dostupné literatuře se mi nepodařilo najít žádnou práci, která by se zabývala přeměnou chlorofylu na feofytin působením kadmia.

Feofytiny vznikají jako degradační produkty chlorofylů nahrazením atomu hořčíku v centru porfyrinového kruhu dvěma protony. Je známo, že těžké kovy také mohou nahradit atom hořčíku v molekule chlorofylu. *In vivo* byla substituce atomu hořčíku v molekule chlorofylu těžkým kovem zaznamenána u rtuti, mědi, kadmia, niklu, zinku a olova. Vznik substituovaného chlorofylu lze sledovat spektrofotometricky, dochází k posunu absorpčního maxima pravého vrcholu chlorofylu. Pokud je však centrální atom hořčíku v molekule chlorofylu nahrazen kadmíem, není spektrofotometrie vhodnou metodou, protože Cd-Chl (chlorofyl, v jehož molekule byl atom hořčíku nahrazen kadmíem) má absorpční maximum příliš blízko maximu chlorofylu s hořčíkem (Küpper a kol., 1996). Uvedené závěry byly ovšem pozorovány v cyklohexanu, je tedy těžké odhadovat chování v methanolu. Z obrázků 10 a 11 na str. 27 je patrné, že absorpční spektra chlorofylů mají stejný tvar se spektry po inkubaci s chloridem kademnatým (ověřeno normalizací na výšku pravých vrcholů chlorofylů, data neuvedena). Je tedy nepravděpodobné, že došlo ke vzniku Cd-Chl. Pro potvrzení či vyvrácení této hypotézy je třeba užít citlivější metodu pro stanovení Cd-Chl. Sanità di Toppi a kol. (2006) nepotvrdili vznik Cd-Chl u lišejníku *Xanthoria parietina* působením kadmia.

Po inkubaci thylakoidních membrán s chloridem kademnatým nedošlo k snížení množství chlorofylu *a* ani *b*, naopak jsem zaznamenala nárůst množství obou chlorofylů, viz tabulky 7a a 7b na str. 28 a 29. V thylakoidních membránách, na rozdíl od methanolového extraktu, jsou chlorofyly chráněny membránovými proteiny. Membránové proteiny pravděpodobně zadržují kademnaté ionty, které tím pádem nemohou proniknout k chlorofylu a způsobit jeho degradaci. Tvar absorpčních spekter po inkubaci thylakoidních membrán s kademnatými ionty zůstává shodný s kontrolou (ověřeno normalizací na výšku pravého vrcholu, data neuvedena), absorbance se po přidání kademnatých iontů zvýšila, viz obrázek 13

na str. 29. Ke stejným závěrům dospěly i Fendrychová (2007) a Antolíková (2007). Po inkubaci s kademnatými ionty jsou thylakoidní membrány promývány MH pufrem, aby došlo k odstranění kademnatých iontů. Při promývání se pravděpodobně ztrácí i určité množství chlorofylu. Antolíková (2007) ve své diplomové práci zdůvodňuje nárůst množství chlorofylu po inkubaci s kademnatými ionty tím, že kadmium je v thylakoidních membránách příčinou pevnějších interakcí mezi proteiny, což vede k tomu, že se chlorofyl z membrán méně odmyvá.

Z grafu na obrázku 12 na str. 28 je patrné, že se v elučním čase feofytinu *a* (63,9 min), objevuje malý pík, který je ovšem přítomný i v kontrole. Jedná se o feofytin *a*, který je součástí PSII. Ani v tomto případě tedy kadmium nezpůsobilo feofytinizaci chlorofylu. Absorpční spektra na obrázku 13 na str. 29 rovněž nevykazují posun k absorpčním spektrům feofytinů.

Otázkou tedy zůstává, zda se chlorofyl působením kadmia částečně přeměňuje na Cd-Chl nebo jaký jiný degradační produkt vzniká, jestliže se chlorofyl skutečně nepřeměňuje na feofytin.

9. ZÁVĚR

- V teoretické části jsem shrnula dosud známé poznatky o vlivu kadmia na fotosyntézu a množství chlorofylu.
- Přítomnost kademnatých iontů snížila množství chlorofylu *a* i chlorofylu *b* v methanolovém extraktu. Mnohem výrazněji bylo sníženo množství chlorofylu *a*.
- Množství chlorofylu vázaného v thylakoidní membráně kademnaté ionty nesnížily, naopak byl pozorován nárůst množství chlorofylu.
- Nebyla zjištěna feofytinizace chlorofylu působením kademnatých iontů.
- V dalších experimentech je třeba zjistit, zda kadmium nahrazuje atom hořčíku v molekule chlorofylu nebo na jakou jinou látku chlorofyl degraduje. Také je třeba ověřit, zda příměs vody v methanolu může usnadnit feofytinizaci chlorofylu vlivem kademnatých iontů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Antolíková E. (2007) Změny ve fotosyntetickém aparátu kukuřice vlivem kadmennatých iontů. Diplomová práce, PŘF UK, Praha

Baryla A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C., Havaux M. (2001) Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212: 696-709

Burzyński M., Kłobus G. (2004) Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica* 42: 505-510

Burzyński M., Źurek A. (2007) Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica* 45: 239-244

Chettri M.K., Cook C.M., Vardaka E., Sadiwis T., Lanaras T. (1998) The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. *Environ. Exp. Bot.* 39: 1-10

Clemens S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-86

Dai L-P., Xiong Z-T., Huang Y., Li M-J. (2006) Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. *Environ. Toxicol.* 21: 505-512

Dong J., Wu F.B., Zhang G.P. (2005) Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6B: 974-80

Eijkelhoff C., Dekker J. P. (1995) Determination of the pigment stoichiometry of the photochemical reaction center of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1231: 21-28

Fendrychová A. (2007) Studium změn v absorpčním spektru chlorofylu způsobených vlivem kadmennatých iontů. Bakalářská práce, PŘF UK, Praha

Hall J.L. (2001) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance.

J. Exp. Bot. 53: 1-11

Sofrová D., Tichá M., Barthová J., Entlicher G., Stiborová M., Novák F., Hudeček J., Hladík J., Krajhanzl A. (2005) Biochemie : Základní kurz, skriptum PřF UK, *nakladatelství Karolinum*, Praha

Küpper H., Küpper F., Spiller M. (1996) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.* 47: 259-266

Lagriffoul A., Mocquot B., Mench M., Vangronsveld J. (1998) Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays L.*). *Plant Soil* 200: 241-250

Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C., Morel F.M.M. (2005) A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435: 42-42

Manankina E.E., Mel'nikov S.S., Budakova E.A., Shalygo N.V. (2003) Effect of Ni²⁺ on early stages of chlorophyll biosynthesis and pheophytinization in *Euglena gracilis*. *Russ. J. Plant Physiol.* 50: 390-394

Ouzounidou G., Moustakas M., Eleftheriou E.P. (1997) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum L.*) leaves. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 154-160

Pavlová L. (2005) Fyziologie rostlin, skriptum PřF UK, *nakladatelství Karolinum*, Praha

Prasad M.N.V. (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* 35: 525-545

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998) Fyziologie rostlin, *Academia*, Praha

Rodríguez M.C., Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V., Conforti V., Gualtieri P. (2007) Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Res.* 105: 234-239

Sanità di Toppi L., Musetti R., Vattuone Z., Pawlik-Skowrońska B., Fossati F., Bertoli L., Badiani M., Favali M.A. (2005) Cadmium distribution and effects on ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina*. *Microsc. Res. Tech.* 66: 229-238

Voet D., Voetová J. G. (1995) *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha

Zítka O., Stejskal K., Kleckerová A., Adam V., Beklová M., Horna A., Šupálková V., Havel L., Kizek R. (2007) Využití elektrochemických technik pro analýzu biologických vzorků. *Chem. Listy* 101: 225-231