

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Anna Fendrychová

### **Studium změn v absorpčním spektru chlorofylu způsobených vlivem kademnatých iontů**

Katedra biochemie

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

2007

Děkuji panu doktoru Kučerovi za ochotu a vstřícnost, kterou mi věnoval během všech konzultací, a za velmi cenné rady a připomínky při tvorbě této práce. Děkuji Pavlu Hejbalovi za vydatnou pomoc při formátování této práce.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejněním.

V Praze dne 13.5. 2007

Anna Fendrychová

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>5</b>
1.1 Kadmium . . . . .	5
1.2 Transport kadmia v rostlinách . . . . .	6
1.3 Faktory ovlivňující dostupnost kadmia . . . . .	8
1.4 Jak kadmium škodí . . . . .	9
1.5 Kadmium a fotosyntéza . . . . .	11
1.5.1 Fotosyntetický aparát sinic . . . . .	11
1.5.2 Působení kadmia na fotosyntézu . . . . .	13
1.6 Působení kadmia na fotosyntetické pigmenty . . . . .	14
1.7 Cíl práce . . . . .	16
<b>2 Materiál a metody</b>	<b>17</b>
2.1 Příprava thylakoidních membrán . . . . .	17
2.2 Inkubace s kadmiem . . . . .	17
2.3 Feofytinizace chlorofylu . . . . .	18
<b>3 Výsledky</b>	<b>20</b>
<b>4 Diskuze</b>	<b>23</b>
<b>Literatura</b>	<b>27</b>

## Seznam zkratk

ALA – kyselina  $\alpha$ -aminolevulová

ATP – adenosintrifosfát

ATPasy – enzymy ze třídy hydrolas využívající ATP jako zdroj energie

CDF – proteiny usnadňující difuzi kationtů (z angl. *cation diffusion facilitator*)

D1, D2 – proteiny PS2

DNA – deoxyribonukleová kyselina

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

HMW – vysokomolekulární látky (z angl. *high molecular weight*)

Hsp – proteiny teplotního šoku (z angl. *heat shock protein*)

Chl – chlorofyl

IRT – proteiny tzv. ZIP rodiny přenášející železo

LHC – světlosběrný komplex (z angl. *light harvesting complex*)

LMW – nízkomolekulární látky (z angl. *low molecular weight*)

NADPH – nikotinamidadenosindinukleotidfosfát

Nramp – z angl. *Natural resistance associated macrophage proteins*

OEC – komplex vyvíjející kyslík (z angl. *oxygen evolving complex*)

PAL – enzym katalyzující vznik anthokyanů (z angl. *phenylalanin ammonia lyasa*)

PBG – porfobilinogen

PEPC – fosfoenolpyruvát karboxylasa

PHQ – feofytinizační koeficient

POR – protochlorofilid oxidoreduktasa

PS1 – fotosystém 1

PS2 – fotosystém 2

PsaC, PsaD, PsaF – proteiny PS1

RuBisCO – ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

ZIP – proteiny asociované v buněčné membráně (z angl. *zeta-interacting protein*)

ZRT – proteiny ZIP rodiny přenášející zinek

# Kapitola 1

## Úvod

### 1.1 Kadmium

Kadmium je toxický prvek II.B skupiny periodické tabulky. Je to stříbrně bílý kujný těžký kov bez zápachu (může se vyskytovat i jako šedobílý prášek). Je rozpustný v kyselině dusičné, v horké kyselině sírové, acetonu, methanolu a nerozpustný ve vodě. Kadmium bylo objeveno roku 1817, ale komerčně se používá až od konce 19. století. Zpočátku se přidávalo do barviv, v malých množstvích také do zubních amalgámů. Od druhé světové války našlo své místo převážně při výrobě baterií, ve slitinách, nátěrech, elektrickém pokovování, stabilizaci plastů atd. V přírodě se nevyskytuje ve své čisté podobě, ale převážně jako sulfid kademnatý (CdS). Vzniká také jako vedlejší produkt při zpracování zinku (kolektiv autorů, U.S. Dept. of Health and Human services, 2001). Má neobvykle nízký bod varu ( $765\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), takže se velmi lehko vypařuje a dostává do ovzduší. V půdě se váže na látky rozpuštěné ve vodě, ale slaběji než jiné kovy, jako Cu, Pb nebo Hg. Tvoří velmi pevné komplexy s chloridy. V oblastech, které lidé neznečistili průmyslovou a jinou činností, nalézáme kadmium jako pozůstatek horotvorných procesů (Prasad, 1995). V posledních letech je zřejmý jeho špatný dopad na zdraví živých organismů, mnohokrát zvýšený automobilovou dopravou, používáním umělých hnojiv atd. Proto je jeho výroba a používání regulováno. Živočichové získávají asi 70 % kadmia z rostlin (Ouzounidou a kol., 1996), a bylo prokázáno, že tento prvek je pro ně karcinogenní. Hromadí se hlavně v ledvinách a játrech (kolektiv autorů,

U.S. Dept. of Health and Human services, 2001). V rostlinách má negativní vliv na růst a fotosyntetickou aktivitu. Přijímáno nemusí být jenom kořeny ze znečištěné vody, ale i listy ze zamořeného vzduchu. Ukládáno je převážně v listech (Ouzounidou a kol., 1996). Rostliny jsou schopny tzv. fytoremediace, procesu, kdy ze zamořené půdy nebo vody vyčytávají a ukládají v sobě toxické látky – těžké kovy, ale i některé toxické organické látky. Existují i rostliny schopné hyperakumulace kadmia. Patří mezi ně např. *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri*, *Solanum nigrum*, heřmánek *Matricaria recutita* a další (Wei, Zhou, Koval, 2006; Pavlovič a kol., 2006)

## 1.2 Transport kadmia v rostlinách

Kadmium může být v rostlinách transportováno samostatně jako  $\text{Cd}^{2+}$  nebo ve formě konjugátů – s fytochelatinu a metalothioneiny. Transport kadmia probíhá obdobně jako transport jiných kovů, ať už esenciálních či nikoliv. Kovy mohou být v rostlině přenášeny mnoha způsoby. Ty, které nevykazují biologickou aktivitu, jsou skladovány ve vakuole (u rostlin, které vakuolu mají). Tím se rostliny chrání před jejich toxicitou. Bylo objeveno několik skupin přenašečů:

- ZIP rodina – proteiny přenášející převážně zinek (ZRT) a železo (IRT). IRT je syntetizován, chybí-li rostlině železo. Má širokou vazebnou specificitu. ZRT jsou odpovědné nejen za příjem zinku, ale i za uvolňování zinku z vakuoly (Clemens, 2000).
- Nramp (z angl. *Natural resistance associated macrophage proteins*). Vyskytují se nejen u rostlin, ale i u bakterií, hub a živočichů. Podílejí se na stálé koncentraci železa (Clemens, 2000).
- Antiportéry kationtů, vyměňující  $\text{Na}^+$  a  $\text{H}^+$  za  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ABC transportéry – transmembránové proteiny, využívající k přenosu různých látek (produkty metabolismu, lipidy, steroly aj.) energii ve formě ATP.

- CDF (z angl. *cation diffusion facilitators*), proteiny usnadňující difusi. Váže se na ně  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  a  $Cd^{2+}$ . Nacházejí se u bakterií, hub, rostlin a živočichů. Dalšími látkami zprostředkujícími transport kovů mohou být organické kyseliny a aminokyseliny. Kovy tvoří vazby s O, N a S v jejich řetězcích. Kupř. citrát, malát a oxalát přenášejí kovy xylemem, ukládají je do vakuol a napomáhají tak rostlinám při toleranci k toxickým kovům (Mendoza-Cozatl a kol., 2005; Král'ová a kol., 2005).

Byl prokázán přenos IRT1 a ZRT1 transportéry a také AtNramp3 ze skupiny Nramp proteinů. Kadmium je v rostlinách chelátováno fytochelatinu a metalothioneiny. Fytochelatinu jsou polymerní deriváty glutathionu a mají jednoduchou strukturu:  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , kde n se pohybuje mezi 2 a 11. Kadmium, s nímž fytochelatinu tvoří komplexy, se na ně váže přes síru. V cytosolu jsou tyto komplexy nízkomolekulární (LMW – z angl. *low molecular weight*), dobře pohyblivé, ve vakuolách se začleněním více sulfidických skupin mění na vysokomolekulární (HMW – z angl. *high molecular weight*) (Clemens, 2000). Fytochelatinu a metalothioneiny jsou spolu s přenašeči zodpovědné za schopnost rostlin tolerovat určité koncentrace kadmia. Syntézu fytochelatinu, která začíná od glutathionu, katalyzuje enzym  $\gamma$ -glutamylcysteindipeptidyl transpeptidasa. Syntéza enzymu je indukována přítomností těžkého kovu, enzym má schopnost autoregulace. Bylo popsáno, že se začne syntetizovat asi 5 minut poté, kdy se rostlina setká s kadmíem (pokud je Cd v dostatečně vysoké koncentraci). Je tedy v podstatě regulován kadmíem (Clemens, 2000). Rostliny vyvinuly i řadu jiných mechanismů tolerance k těžkým kovům. Patří k nim kupř. uvolňování ethylenu (ethylen patří ke stresovým fytohormonům) a také stresových proteinů. Jsou to převážně tzv. proteiny teplotního šoku (hsp – z angl. *heat shock proteins*), kterých je celá řada. V chloroplastech se při zamoření kadmíem vylučují tzv. malé proteiny teplotního šoku, které chrání fotosyntetický aparát nejen před Cd, ale i před jinými těžkými kovy (Heckathorn a kol., 2004). Při pěstování rajčete *Lycopersicon peruvianum* v médiu s poměrně vysokým obsahem kadmia (1 mM) byl nalezen hsp 70. Tento protein se váže na plazmatickou a mitochondriální membránu a také na membránu endoplazmatického retikula. Má velkou afinitu k poškozeným proteinům (tedy také k těm, které poškodilo kadmium a narušilo jejich strukturu) a je schopen je znovu složit do původního

stavu a vrátit jim tak jejich funkčnost (Sanità di Toppi a Gabrielli, 1998). Jako ochrana funguje také imobilizace toxických kovů v buněčné stěně, která je umožněna její strukturou. Kadmium se zde váže na vazebná místa pro pektiny a na histidinové zbytky.

Odlišná situace nastává u organismů, které nemají vakuoly, jakými jsou například řasy a sinice. Řasy ukládají kadmium do chloroplastů nebo do jádra (sinice jakožto prokaryotní organismy ani jádro ani chloroplasty nemají). To je ale před jeho toxicitou nechrání, naopak kadmium je pro ně v těchto organelách velmi škodlivé (Mendoza-Cozatl a kol., 2001). Transport do chloroplastů je obdobný transportu do vakuol. V chloroplastech krásnoočka *Euglena gracilis* byly zjištěny dva způsoby přenosu  $\text{Cd}^{2+}$ . Prvním je proteinový přenašeč, druhým usnadněná difuze. Usnadněnou difuzi zajišťují opět proteiny CDF a ZIP rodiny nebo nespecifický transport, pravděpodobně  $\text{Ca}^{2+}$  kanálem (Mendoza-Cozatl a kol., 2005). V tomto krásnoočku byla také zjištěna přítomnost thiolových sloučenin, jako jsou fytochelatiny, glutathion a cystein, zajišťujících částečnou rezistenci ke kadmiu (Mendoza-Cozatl a kol., 2001).

### 1.3 Faktory ovlivňující dostupnost kadmia

Dostupnost kadmia není pro všechny rostliny a hlavně ve všech typech půd stejná. Obecně závisí na pH, množství rozpuštěných chloridů a organické hmoty, ale také na přítomnosti některých jiných těžkých kovů. Kupř. vyšší koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v půdě snižuje dostupnost kadmia, protože s ním soupeří o vazebná místa na membránových přenašečích. Také nízké pH snižuje schopnost kadmia pronikat do rostlin (přestože při nízkém pH se obvykle kovy lépe rozpouštějí a uvolňují do roztoku). Nízké pH odpovídá vysoké koncentraci  $\text{H}^+$  iontů. Ty s kadmiem soupeří podobně jako  $\text{Ca}^{2+}$ . Velké množství rozpuštěné organické hmoty působí také negativně na pohyb kadmia z půdy do kořenů, jelikož se kadmium na organickou hmotu váže, i když slaběji než jiné těžké kovy (Prasad, 1995). Dostupnost záleží samozřejmě také na koncentraci samotného kadmia a době, po kterou byly rostliny kadmiu vystaveny. Koncentrace se pohybují obvykle od  $1 \mu\text{M}$  až po  $0,1 \text{mM}$  bez toho, že by byla pozorována nějaká saturace přenosu přes buněčné membrány (Mendoza-Cozatl a kol.,



2006). U příliš vysokých koncentrací je dostupnost saturovatelná, což souvisí s množstvím přenašečů v membránách kořenů rostlin.

## 1.4 Jak kadmium škodí

Obecně je toxicita těžkých kovů zapříčiněna hlavně narušením vodních poměrů v rostlině, a tím i příjmu živin a drastickým zpomalením růstu (Burzyński a Klobus, 2004). V živých organismech se kadmium váže převážně na thiolové skupiny proteinů, aminokyselin a jiných organických látek. Kadmium brání klíčení semen (Ouzounidou a kol., 1996), zpomaluje růst. Jedna cesta, jak může bránit růstu, je snížení množství iontu  $\text{Ca}^{2+}$ . Pokles koncentrace vápenatých iontů se objevuje u rostlin vystavených kadmii.  $\text{Ca}^{2+}$  je nezbytný pro růst buněčné stěny a udržování soudržnosti membrán (Ouzounidou a kol., 1996). Kadmium také inhibuje mitózu, snižuje množství látek potřebných ke stavbě buněčných membrán a ničí Golgiho aparát (Pavlovič a kol., 2006). Některé práce nasvědčují tomu, že ovlivňuje přenos a zpracování růstových hormonů auxinů (Prasad, 1995)). Ve fotosyntetizujících rostlinách způsobuje útlum fotosyntézy, váže se na chlorofyl a brzdí jeho syntézu. (Možná tak, že brání transportu železa, které je pro tvorbu chlorofylu nezbytné (Burzyński a Klobus, 2004). Nebo inhibuje enzym protochlorofylidreduktasa, který se účastní syntézy chlorofylu (Ouzounidou a kol., 1996).) Při nedostatku chlorofylu se objevuje chloróza. Cd způsobuje pokles příjmu vody a živin, redukcí hmoty kořenů a jejich hnědnutí (Faller a kol., 2004; Dai a kol., 2006; Otero a kol., 2006), kroucení a hnědnutí okrajů listů, červenání žil a řapíků listů (Ouzounidou a kol., 1996). Prokázán byl také vznik volných kyslíkových radikálů během vystavení rostlin kadmii a jiným těžkým kovům. Volné kyslíkové radikály jsou velmi reaktivní a škodlivé, mohou narušovat buněčné membrány, poškozovat proteinové a DNA řetězce, narušovat funkce enzymů (Dai a kol., 2006; Otero a kol., 2006). Oxidativní stres nemusí být vyvolán jenom vznikem volných kyslíkových radikálů, kadmium také deaktivuje řadu antioxidantních enzymů, mezi nimi superoxid dismutasy, katalasy, askorbát peroxidasy a další (Sanità di Toppi a Gabrielli, 1998). Kadmium také brání otvírání průduchů a značně snižuje jejich množství. Tím, že soupeří s  $\text{Ca}^{2+}$  o vazebná

místa na transportních proteinech a  $\text{Ca}^{2+}$  kanálech, způsobuje změny ve vodních poměrech a obsahu živin v průvodních buňkách průduchů. Snižuje také dostupnost kyseliny abscisové, dalšího důležitého fytohormonu, souvisejícího právě se správnou funkcí průduchů (Prasad, 1995). Omezené množství průduchů souvisí s inhibicí fotosyntézy (kvůli nedostatku  $\text{CO}_2$ ) a dýchání (kvůli nedostatku  $\text{O}_2$ ) (Otero a kol., 2006; Baryla a kol., 2000). Na listech ječmene bylo zjištěno, že kadmium podporuje biosyntézu ethylenu, fytohormonu podílejícího se na stárnutí rostlin (Ouzounidou a kol., 1996). Při pěstování heřmánku *Matricaria recutita* v půdě s vyšším obsahem kadmia začal heřmánek kvést už ve třech týdnech, přičemž obvykle kvete až mezi 8. a 12. týdnem (Pavlovič a kol., 2006).

Výzkumy na jednodušších organismech, řasách a sinicích, ukázaly, že kadmium zpomaluje růst buněk, ale neovlivňuje jejich životnost. Buňky žijící v prostředí s kadmiem jsou schopny replikovat DNA, ale nerozmnožují se. Cytosolické organely mění pod vlivem Cd své uspořádání, kupř. endosomy jsou fragmentovány, stejně tak i chloroplasty, ve kterých je inhibována fotofosforylace a celá fotosyntéza (Mendoza-Cozatl a kol., 2001). Při vystavení sinice *Anabaena flos-aquae* kadmiu byla také velmi narušena struktura thylakoidů. Struktura thylakoidů hraje při fotosyntéze zásadní roli a její narušení vede k inhibici fotosyntézy. Proto narušení vnitřní struktury thylakoidů sinice *Anabaena*, které pravděpodobně souvisí s nedostatkem železa, vedlo k poklesu fotosyntetické aktivity této sinice (Surosz a Palinska, 2003; Ouzounidou a kol., 1996). Z některých prací také vyplývá, že s rostoucí koncentrací kadmia klesá koncentrace chlorofylu (Surosz a Palinska, 2003; Otero a kol., 2006; Svitekova, 2006) a karotenoidů, koncentrace anthokyanů naopak stoupá. Anthokyaniny jsou barviva odpovídající v rostlinách za červenou, fialovou a modrou barvu. Důležitá je i jejich úloha v ochraně rostlin – působí jako antioxidanty. Bylo také zjištěno, že mohou tvořit komplexy s těžkými kovy a tím snižovat jejich toxickou aktivitu. Stejně tak byl pozorován zvýšený obsah fenolických látek, které též působí jako antioxidanty a jejich polymery mohou vázat kadmium a jiné těžké kovy. Při velmi vysokých koncentracích kadmia ale obsah fenolických látek a anthokyanů klesá. Úbytek je pravděpodobně způsoben snížením aktivity PAL (z angl. *phenylalanin ammonia lyasa*), enzymu katalyzujícího vznik anthokyanů (Dai a kol., 2006). Kadmium může ovlivňovat i expresi některých genů.

Nahrazuje zinek v tzv. zinkových prstech, což jsou struktury některých proteinů, které se účastní transkripce (Sanità di Toppi a Gabrielli, 1998). Obecně bývá rozlišováno krátkodobé a dlouhodobé působení kadmia, jehož následky jsou různé, protože po delší době si rostliny začnou vytvářet různé ochranné mechanismy.

Některé výzkumy ukázaly, že kadmium nemusí působit jen škodlivě, naopak v nízkých koncentracích může různé funkce stimulovat. To ale není výjimka ani u jiných stresových faktorů (Pavlová, 2006). Podobně je tomu u hliníku, jenž v nízkých koncentracích urychluje růst rostlin. Pěstujeme-li rostlinu v prostředí s kadmiem o koncentraci  $0,1 \mu\text{M}$ , pozorujeme mírný nárůst biomasy a obsahu chlorofylu a zvětšení listové plochy oproti kontrole. Tento jev není zatím dostatečně objasněn. Patrně se týká větší rozpustnosti a lepší dostupnosti železa (v rostlinách rostoucích na vápenatých půdách), které je chrání před toxicitou fosforu a vyčerpáním zásob vápníku (Dong a kol., 2005; Wu a kol., 2002). Jiný pozitivní účinek může být zapříčiněn ochrannými mechanismy, které si rostlina po vystavení kadmiu vytváří. Příkladem poslouží proteiny, které chrání rostlinu před kadmiem a zároveň před určitým virem. To bylo pozorováno na tuřínu, jedná se o tzv. *'turnip-vein-clearing'* virus (Sanità di Toppi a Gabrielli, 1998).

## 1.5 Kadmium a fotosyntéza

### 1.5.1 Fotosyntetický aparát sinic

Podstatou fotosyntézy je přeměna světelné energie na energii chemickou, která je dále využitelná na biosyntézu organických látek. Přeměna energie fotonů je nazývána primární (nebo světelnou) fází fotosyntézy, fixace uhlíku do organických sloučenin fází sekundární, neboli temnostní. Primární fáze fotosyntézy probíhá u organismů, které při fotosyntéze rozkládají vodu za uvolnění kyslíku, na speciální, thylakoidní membráně. Ta je tvořena dvojvrstvou lipidů. Na rozdíl od jiných membrán buněk, složených převážně z fosfolipidů, jsou ale v thylakoidní membráně přítomny převážně galaktolipidy, tedy tuky vázající cukerné složky. Na proteiny se potom vážou fotosyntetické pigmenty. U prokaryotických sinic vzniká thylakoidní membrána vchlípením plazmatické membrány a leží volně v buňce.

Vyšší rostliny obsahují speciální orgány, plastidy (původem pravděpodobně endosymbiotické sinice), jejichž thylakoidní membrány vznikají vchlipováním vnitřní obalové membrány plastidu. Složkami thylakoidní membrány jsou dva typy pigmentoproteinových komplexů, fotosystém 1 (PS1) a fotosystém 2 (PS2), cytochromový komplex  $bf_6$  a tzv. ATP syntasa. První tři komplexy přenášejí elektron přes membránu (nepropustnou pro ionty  $H^+$ ) za vzniku protonového gradientu a tvorby ATP. PS2 tvoří proteiny  $D_1$  a  $D_2$ , PsbI, heterodimerní cytochrom  $b_{559}$ , OEC (*oxygen evolving complex*) a další proteiny. Na proteinech  $D_1$  a  $D_2$  je reakční centrum s šesti molekulami chlorofylu  $a$ , dvěma molekulami feofytinu, molekulou  $\beta$ -karotenu a dvěma molekulami plastochinonu (Eijkelhoff a Dekker, 1995). Někde mezi nimi se pravděpodobně nachází atom železa, jehož funkce není ještě docela jasná, ale je pro přenos elektronu nezbytná (Xiong a kol., 1996). Na lumenální straně PS2 se také nachází OEC, který rozkládá vodu za vzniku kyslíku jako vedlejšího produktu, a poskytnutí elektronu pro redukci oxidované molekuly chlorofylu  $a$  (Rutherford a Faller, 2001). OEC se skládá ze tří proteinů, které chrání manganový klastr na proteinu  $D_1$ . Manganový klastr je přichycen dvěma tyrosinovými zbytky, 1 – 2 ionty  $Cl^-$  a iontem  $Ca^{2+}$ , který funguje jako kofaktor (Xiong a kol., 1996).

Reakční centrum PS1 tvoří hydrofobní proteiny PsaC a PsaD, které vážou dvě molekuly chlorofylu  $a$ , tzv. specifický pár, absorbující světelné záření o vlnové délce 700 nm. Protein PsaD je navíc v interakci s ferredoxinem na stromální straně membrány. Na lumenální straně je další protein, PsaF, který interaguje s pohyblivým plastocyaninem, přenášejícím elektron (pro redukci oxidované molekuly chlorofylu  $a$ ) na centrum s typickou 4Fe-4S strukturou.

Energii ze slunečních paprsková pro reakční centra zajišťují tzv. anténní komplexy (LHC – z angl. *light harvesting complex*), proteiny obsahující molekuly chlorofylu  $a$  a  $b$  a karotenoidy. Ty zachycují energii ve formě fotonů a předávají ji molekulám chlorofylu  $a$  v reakčním centru. Mezi karotenoidy patří i látky zvané xanthofyly. Jsou to kyslíkaté karotenoidy, které chrání chlorofyl před tzv. tripletní excitací (tato excitace souvisí se změnou spinu daného elektronu). Chlorofyl v tripletním stavu má velmi dlouhou životnost, která zvyšuje pravděpodobnost náhodné srážky této molekuly např. s molekulou kyslíku.

Tripletní chlorofyl převádí kyslík do tzv. singletního stavu, v němž je kyslík jedním z nejagresivnějších oxidačních činidel a může velice poškodit fotosyntetický aparát (Šetlík).

Prokaryotické sinice a eukaryotické ruduchy nemají LHC, ale tzv. fykobilisomy. Fykobilisomy jsou struktury umístěné na stromálním povrchu thylakoidů. Obsahují různé fykobiliproteiny s odlišnými absorpčními spektry uspořádané tak, aby zachytily maximální množství světelné energie a předaly ji do reakčního centra. Uvnitř fykobilisomů je velké množství molekul chlorofylu *a* (sinice obsahují pouze chlorofyl *a*) (Šetlík; 35). Chlorofyl má tedy dvě funkce. V anténních komplexech zachycuje spolu s ostatními barvivy energii světelného záření a předává ji reakčnímu centru. Chlorofyl *a* v reakčním centru se účastní vlastního přenosu elektronu.

### 1.5.2 Působení kadmia na fotosyntézu

Bylo zjištěno, že kadmium inhibuje převážně aktivitu PS2. Nepřímo působí i na PS1. Snižuje množství dostupného železa a brání tak elektronovému toku v PS1 (Nováková a kol., 2004). Mechanismus toxicity  $Cd^{2+}$  vůči PS2 spočívá pravděpodobně v obsazení vazebného místa pro  $Ca^{2+}$  na OEC (v manganovém klastru), čímž brání fotoaktivaci PS2. Proteiny PS2 musejí projít jistou konformační změnou, aby se PS2 stal funkčním a mohl přenášet elektron (Faller a kol., 2004; Král'ová a kol., 2005). Pro tuto změnu potřebují ionty  $Ca^{2+}$  a světlo. Některé práce ukázaly, že toto vazebné místo pro  $Ca^{2+}$  je mnohem méně selektivní ve chvíli, kdy právě probíhá fotoaktivace PS2. Podle některých výzkumů může kadmium už při velmi nízkých koncentracích (mikromolárních) inhibovat fotosyntézu a uvolňování kyslíku, ale pouze je-li přidáváno k PS2 v jeho neaktivní formě. Poté, co PS2 projde fotoaktivací a stane se plně funkčním, musíme přidat řádově více kadmia než prve (Faller a kol., 2004). Zhou a kol. (2006) zkoumali sinici *Microcystis aeruginosa* a její odpovědi na stres způsobený různými koncentracemi kadmia. I při jeho vysokých koncentracích pozorovali pozitivní efekt na PS1. Došli k závěru, že kadmium inhibuje ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasu. Tento enzym se účastní přenosu elektronu z redukováného ferredoxinu na NADP<sup>+</sup> a redukuje jej. Fotosyntéza ale není závislá jen na tomto kroku, elektron může být cyklicky přenášen z ferredoxinu zpět na cytochromový komplex.

Při těchto reakcích nevzniká sice NADPH, ale tvoří se ATP. Aktivita PS1 (vzhledem ke tvorbě ATP) se tedy zvyšuje, právě díky nutnosti cyklického přenosu elektronu. Takže kadmium neovlivňuje samotné komplexy PS1 a PS2, ale konec elektronového transportního řetězce.

## 1.6 Působení kadmia na fotosyntetické pigmenty

Bylo prokázáno, že kadmium má negativní vliv na obsah fotosyntetických barviv v rostlinách (Surosz a Palinska, 2003; Dai a kol., 2006; Ouzounidou a kol., 1996; Wu a kol., 2002; Nováková a kol., 2004; Sanità di Toppi a kol., 2005). Jak jsem uvedla výše (1.5.1), kadmium způsobuje nejen pokles množství chlorofylu, ale i karotenoidů. Chlorofyly jsou tetrapyroly s uzavřeným řetězcem, uzavírajícím ve svém středu atom hořčíku. Karotenoidy jsou tetraterpenoidy s řetězcem otevřeným. Jedno z možných vysvětlení úbytku chlorofylu je snižování množství karotenoidů. Ty chrání chlorofyl před fotooxidací, takže jejich nedostatek může nepřímo zapříčinit úbytek chlorofylu (Dai a kol., 2006).

Kadmium má také inhibiční účinky na mnoho enzymů, mezi ně patří i enzymy katalyzující syntézu chlorofylu. Biosyntéza chlorofylu je odvozena od kyseliny  $\alpha$ -aminolevulové (ALA), která vzniká z glutamátu aktivovaného tRNA. Dvě molekuly ALA kondenzují za vzniku porfobilinogenu (PBG), reakce je katalyzována reduktasou ALA. Čtyři PBG nakonec tvoří protoporfyrin IX. Další krok katalyzuje enzym magnesium chelatasa, který naváže do středu molekuly atom hořčíku. Protochlorofylid vzniká z protoporfyrinu za účasti enzymu protochlorofylid oxidoreduktasy (POR). POR pracuje pouze na světle a je NADPH dependentní. (Existují i fotosyntetické bakterie, které umějí syntetizovat bakteriochlorofyl bez přítomnosti světla, ale ty využívají jiné enzymy. Tyto bakterie neuvolňují při fotosyntéze kyslík. Některé sinice, řasy a nižší rostliny využívají k tvorbě chlorofylu obě cesty.) Enzym chlorofyl synthasa nakonec připojí na tetrapyrolové jádro fytolový zbytek a vzniká chlorofyl. Syntéza chlorofylu probíhá v chloroplastech. Kadmium inhibuje funkci enzymů hydratasy ALA a POR (Dai kol., 2006; Ouzounidou a kol., 1996). Také bylo zjištěno, že u některých rostlin naopak stimuluje funkci enzymu lipoxygenasy, který odpovídá za

degradaci chlorofylu (Pavlovič a kol., 2006).

Jiný mechanismus snížení množství chlorofylu je degradace již existujícího chlorofylu. Tento jev je lépe popsán pro jiné kovy než pro Cd. Například v lišejníku *Cladonia convulata* byla pozorována přeměna chlorofylu *a* v chlorofyl *b* za přítomnosti atomů Cu. Koncentrace chlorofylu *a* totiž klesala po vystavení tohoto lišejníku mědi, ale celkové množství chl *a* a chl *b* se prakticky nezměnilo. Chl *a* se tedy pravděpodobně přeměnil v chl *b* oxidací methylové skupiny na druhém kruhu tetrapyrolového jádra. Naproti tomu se po vystavení jiného lišejníku, *Xanthoria parietina*, kadmiu změnilo celkové množství chl *a* a chl *b* i poměr chl *a*/chl *b*. Z toho plyne, že chl *a* se nemění v chl *b*. Autoři proto zkoumali, jestli se chl *a* nemění na feofytin (Sanità di Toppi a kol., 2005). Feofytin je barvivo nacházející se vedle molekul chlorofylu *a* v reakčním centru PS2 (Eijkelhoff a Dekker, 1997) a přirozeně vzniká degradací chlorofylu. Neobsahuje v centru své molekuly atom hořčíku. Množství chlorofylu přeměněného na feofytin vyjadřuje tzv. feofytinizační koeficient (PHQ). U lišejníků se PHQ používá jako jeden z ukazatelů jejich zdravotního stavu. Nicméně PHQ se po přidání kadmia k lišejníku *Xanthoria* nezměnil oproti pěstování bez kadmia. Úbytek chlorofylu byl pravděpodobně způsoben narušením některého kroku v biosyntéze chlorofylu (Sanità di Toppi a kol., 2005). Řepka olejka pěstovaná při vyšších koncentracích kadmia také ztratila velké množství chlorofylu. U ní ale nebylo zpozorováno žádné hromadění protochlorofylidu, takže enzym POR fungoval nejspíš normálně. Nezažnamenali ani poruchy v aktivitách jiných enzymů souvisejících s biosyntézou chlorofylu, ani změny v absorpčním spektru chlorofylu *a*, napovídající, že by se chlorofyl měnil substitucí centrálního atomu hořčíku na nějakou jinou látku. Úbytek chlorofylu vysvětlují tím, že kadmium bránilo rozmnožování chloroplastů. V jednotlivých chloroplastech bylo chlorofylu stejné množství jako ve srovnávacích rostlinách, ale celkový počet chloroplastů a tedy i chlorofylu se rapidně snížil (Baryla a kol., 2000). Také Zhou a kol. (2006) uvedli, že kadmium ničí fykobilisomy sinic.

## 1.7 Cíl práce

Vyhledat v literatuře dostupné informace o vlivu kadmia na fotosyntetizující organismy, o jeho působení na fotosyntetický aparát a především fotosyntetické pigmenty rostlin a sinic. Pozorovat přímé působení kadmia na chlorofyl *a* sinice *Synechococcus elongatus*.



# Kapitola 2

## Materiál a metody

### 2.1 Příprava thylakoidních membrán

Termofilní sinice *Synechococcus elongatus Nageli*, byly dlouhodobě pěstovány v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Třeboni. Já jsem měla k dispozici suspenzi sféroplastů, uchovávanou v chladicím boxu při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sféroplasty byly získány suspendací a dvouhodinovým protřepáním buněk sinice v pufru MHM (viz tab. 3.1), který obsahoval asi 0,2 % lysozymu. Suspenzi sféroplastů jsem promyla hypotonickým pufrům MH (viz tab. 4.1) a získala jsem tak thylakoidní membrány. Roztok jsem odstředila na centrifuze MPW-300 (5 min), supernatant s rozpuštěnými modrými fykobiliproteiny jsem odstranila. Promytí pufrům MH jsem opakovala několikrát.

### 2.2 Inkubace s kadmíem

Chlorofyl jsem rozpouštěla v methanolu. Díky tomu, že  $\text{CdCl}_2$  je rozpustný v methanolu (i když velice špatně), měla jsem dvě možnosti, jak kadmium k chlorofylu přidávat.

- (a)  $\text{CdCl}_2$  jsem rozpustila v pufru MH, aby jeho koncentrace byla 250 mM. Ke 3  $\mu\text{l}$  suspenze thylakoidních membrán (koncentrace chlorofylu byla 1,022 mg/l) jsem přidala vždy 1 ml roztoku  $\text{CdCl}_2$  v pufru MH. (250 mM roztok  $\text{CdCl}_2$  jsem kombinovala s čistým MH pufrům tak, abych získala různé výsledné koncentrace kadmia, viz

tab. 3.2) Membrány jsem s kadmíem inkubovala 45 min v lednici. Pak jsem je opět třikrát promyla pufrům MH, abych se zbavila kademnatých iontů. Po odstředění na centrifuze MPW-300 (5 min) jsem supernatant vždy slila a promývala znova. Po posledním promytí jsem pelet suspendovala v několika mikrolitrech pufru MH. Tuto suspenzi jsem extrahovala 1 ml methanolu. Roztok jsem promíchala a odstředila. Absorbanci supernatantu (rozpuštěný chlorofyl a karotenoidy) jsem měřila na spektrofotometru Helios  $\alpha$ , proměřovala jsem spektrum od 350 do 750 nm.

(b)  $\text{CdCl}_2$  (množství viz tab. 3.3) jsem rozpustila v 1 ml methanolu a pak jsem tímto roztokem extrahovala opět 3  $\mu\text{l}$  suspenze thylakoidních membrán. Měření absorbance jsem provedla stejně jako v bodě (a).

## 2.3 Feofytinizace chlorofylu

Feofytin jsem připravovala okyselením thylakoidních membrán podle Eijkelhoffa a Dekkera (1997). 3  $\mu\text{l}$  suspenze thylakoidních membrán jsem suspendovala v 1 ml 0,75M kyseliny chlorovodíkové v pufru MH. Kyselinu jsem nechala působit asi 30 min, roztok jsem poté odstředila na centrifuze, supernatant slila a pelet rozpustila v 1 ml methanolu. Absorpční spektrum feofytinu jsem měřila v rozmezí 350-750 nm.

Tabulka 2.1: Složení pufrů MHM a MH

pufr	složení	koncentrace (mM)	hmotnost (g)	pH	objem (l)
MHM	$\text{MgCl}_2$	5	1,0167	6,5	1
	HEPES	20	4,776		
	D - manitol	500	91,09		
MH	$\text{MgCl}_2$	5	0,5084	6,5	0,5
	HEPES	20	2,383		

Tabulka 2.2: Koncentrace kadmnatých iontů v roztocích připravených metodou (a) (viz kap.3.2)

č.	objem 250 mM CdCl <sub>2</sub> (ml)	objem čistého pufru MH (ml)	koncentrace Cd <sup>2+</sup> (M)
1	0	1	0
2	0,1	0,9	0,025
3	0,4	0,6	0,100
4	0,6	0,4	0,150
5	0,9	0,1	0,225

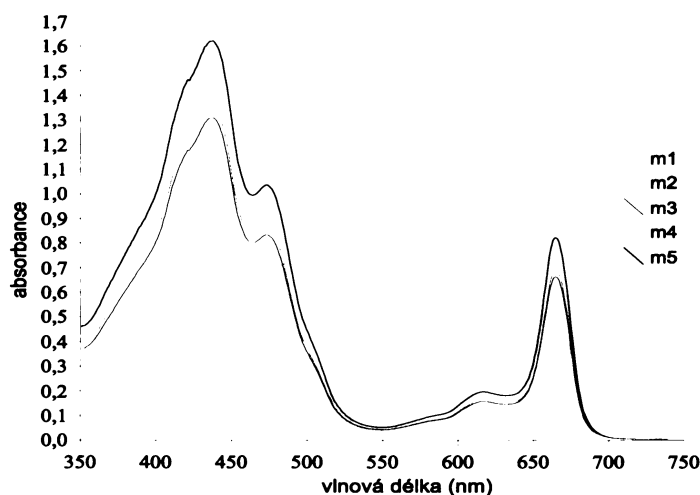
Tabulka 2.3: Koncentrace kadmnatých iontů v roztocích připravených metodou (b) (viz kap.3.2)

č.	hmotnost (g)	koncentrace Cd <sup>2+</sup> (M)
1	0,0565	0,025
2	0,0114	0,050
3	0,0228	nasyčený roztok

# Kapitola 3

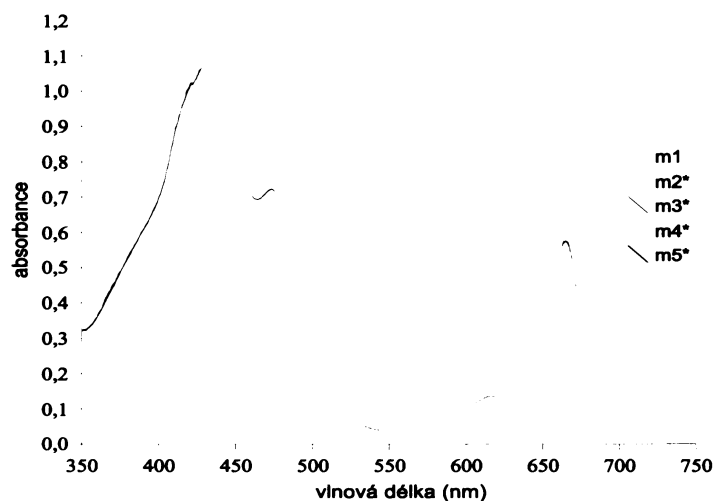
## Výsledky

Získaná absorpční spektra jsem zpracovala graficky. Všechny grafy představují závislost absorpční spektra absorbance pigmentového extraktu ze suspenze thylakoidních membrán sinice *Synechococcus elongatus* na koncentraci přidaných kadmnatých iontů.



Obrázek 3.1: Absorpční spektra pigmentového extraktu inkubovaného 45 min v lednici s různými koncentracemi Cd<sup>2+</sup>: m<sub>1</sub> – 0M; m<sub>2</sub> – 0,0225M; m<sub>3</sub> – 0,1M; m<sub>4</sub> – 0,15M; m<sub>5</sub> – 0,225M roztok Cd<sup>2+</sup>

Byly získány i jiné hodnoty než ty, které uvádím v grafech. Při inkubaci thylakoidních membrán s kadmnatými ionty se v naměřených spektrech občas objevoval posun absorpčního spektra chlorofylu *a* směrem k feofytinu. Tento posun však nevykazoval žádnou

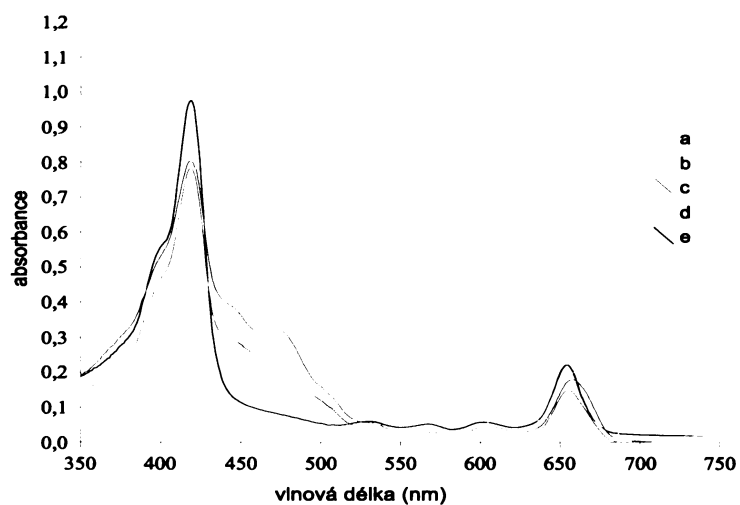


Obrázek 3.2: Normalizace předchozího grafu na výšku levého vrcholu  $m_1$ , tedy pigmentů (chlorofylu  $a$  a karotenoidů) inkubovaných s 0M roztokem kadmnatých iontů;  $m_2^*$ ,  $m_3^*$ ,  $m_4^*$ ,  $m_5^*$  představují stejné koncentrace kadmia jako v předchozím grafu, jejich absorbance jsou přepočítány podle  $m_1$ .

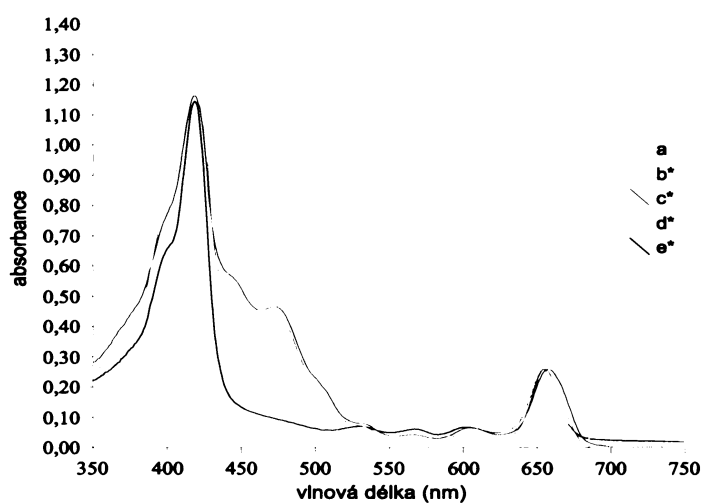
závislost na koncentraci přidaného kadmia. Někdy došlo k úplné, jindy pouze k částečné feofytinizaci.

Tabulka 3.1: Koncentrace feofytinu získaného: rozpouštěním chl  $a$  v nasyceném roztoku  $Cd^{2+}$  v methanolu (feo1); okyselením thylakoidních membrán 0,75M HCl (feo2).

pigment	absorbance při 666nm	koncentrace pigmentu (mM)	konc. pigmentu (%)
chl $a$	0,2580	2,735	100
feo 1	0,1110	1,118	40,9
feo 2	0,1053	0,112	40,7



Obrázek 3.3: Absorpční spektrum pigmentového extraktu rozpuštěného v roztoku methanolu s různými koncentracemi  $\text{Cd}^{2+}$ : a – 0M; b – 0,0225M; c – 0,05M; d – nasycený roztok  $\text{Cd}^{2+}$ ; e – feofytin (získaný okyselením suspenze thylakoidních membrán 0,75M HCl)



Obrázek 3.4: Normalizace předchozího grafu na výšku levého vrcholu křivky a (methanolového extraktu pigmentů s 0M koncentrací  $\text{Cd}^{2+}$ ); b\*, c\*, d\*, e\* představují stejné koncentrace  $\text{Cd}^{2+}$  jako v předchozím grafu, jen přepočítané pro normalizaci.

# Kapitola 4

## Diskuze

Moje práce navazovala na diplomovou práci Lucie Svitekové (Sviteková, 2006). Sviteková sledovala vliv kademnatých iontů na aktivitu PS2 sinice *Synechococcus elongatus* a zjistila, že po inkubaci s kadmiiem klesá v thylakoidních membránách koncentrace chlorofylu *a*. Množství chlorofylu *a* se při měření aktivit fotosystému používá jako ukazatel množství samotného vzorku (PS2), protože chlorofyl *a* je součást fotosystémů. Zjistíme-li tedy nižší koncentraci chlorofylu *a*, předpokládáme, že je ve studovaném roztoku nižší koncentrace vzorku. Pokud by ale kadmium nějakým způsobem chlorofyl poškozovalo, byly by výsledky zkreslené. Stačilo by, aby pouze měnilo jeho absorpční spektrum, vzhledem k tomu, že se absorbance měří při jediné vlnové délce 666 nm (pravý vrchol absorpčního spektra chlorofylu *a*). Cílem mé práce bylo proto zjistit, jak se mění absorpční spektrum chlorofylu *a* (přesněji celkového pigmentového extraktu ze sinice *Synechococcus elongatus*) při různých koncentracích kademnatých iontů, a pokud možno najít závislost této změny na koncentraci kademnatých iontů.

Sviteková měřila absorbance při vlnové délce 666 nm, kde má chlorofyl *a* jeden ze dvou absorpčních vrcholů. Já jsem proměřovala celá absorpční spektra celkového pigmentového extraktu (karotenoidy a chlorofyl *a* rozpuštěné v methanolu), zvláštní pozornost jsem ale věnovala pravému vrcholu (kolem 660 nm). Z grafů (viz kap. 4) je patrné, že okolo vlnové délky 660 nm dochází ke dvěma změnám. Po přidání kadmia se:

(a) tvar absorpčního spektra chlorofylu nemění, pouze se zvyšuje absorbance se zvyšující

se koncentrací kadmnatých iontů (viz obr. 4.1 a 4.2).

- (b) absorpční spektrum chlorofylu posunuje směrem k absorpčnímu spektru feofytinu (viz obr. 4.3 a 4.4). Levý vrchol chlorofylu *a* se posouvá doleva a výrazně roste se zvyšující se koncentrací kadmnatých iontů, pravý klesá.

Pro srovnání jsem si připravila také feofytin, okyselením thylakoidních membrán 0,75 M HCl (Riemann, 1997). Z normalizace absorbancí vzorků s různými koncentracemi kadmia, jejichž spektrum se výrazně měnilo, na hodnotu absorbance chlorofylu *a* při 666 nm je zřejmé, že absorpční spektra jsou až na výšku vrcholů shodná s absorpčním spektrem feofytinu (viz obr. 4.4). Výjimku tvoří oblast vpravo od levého vrcholu (kolem 470 nm), kde absorbují karotenoidy. Po okyselení 0,75M HCl absorpční vrcholy karotenoidů mizí. Riemann (1978) popisuje změny v absorpčních spektrech karotenoidů (konkrétně fukoxanthinu), chlorofylu *a* a celkového pigmentového extraktu z přirozených populací fytoplanktonu po okyselení kyselinou chlorovodíkovou. Chlorofyl *a* se mění na feofytin *a*. V tomto spektru zdánlivě mizí karotenoidy. Riemann však ukazuje, že okyselení fukoxanthinu, který má jeden vrchol kolem 450 nm, 0,1M HCl, způsobí posun v absorpčním spektru z modré oblasti do červené (kolem 700 nm), takže vrchol při 450 nm mizí. V literatuře jsem nenašla zmínku o tom, jak na absorpční spektrum karotenoidů působí kadmium. Znáám je pouze fakt, že koncentrace karotenoidů v rostlinách pěstovaných v kultuře s kadmnatými ionty klesá se zvyšující se koncentrací kadmia (Surosz a Palinska, 2003; Dai a kol., 2006; Otero a kol., 2006). Nicméně podle mých výsledků se zdá, že kadmium neposunuje absorpční spektra karotenoidů stejně jako kyselé prostředí, protože absorpční spektra thylakoidních membrán inkubovaných s kadmíem mají dva nízké vrcholy v modré oblasti.

Antolíková (2007) měřila ve své diplomové práci absorpční spektra fotosyntetických pigmentů z thylakoidních membrán špenátu inkubovaných s kadmnatými ionty. Tvar spekter chlorofylu inkubovaného s kadmíem se také neměnil, absorbance se zvyšovala se zvyšujícím se obsahem kadmia (stejně jako při mých inkubacích), respektive se neměnila vlivem kadmia, ale u kontroly se snižovala. Antolíková usoudila, že kadmium je v thylakoidních membránách příčinou pevnějších interakcí mezi proteiny, což vede k tomu, že se např. chlorofyl z membrán méně odmyývá. Po inkubaci s kadmíem jsou totiž thylakoidní



membrány promývány pufrem, aby byly z roztoku odstraněny kademnaté ionty. Při tomto promývání se patrně také ztrácí určité množství chlorofylu. Proto se koncentrace chlorofylu po inkubaci s kadmíem snižuje s klesající koncentrací kademnatých iontů v membránách. (Nejmenší absorbanci jsem naměřila pro nulovou koncentraci kademnatých iontů). Jednou z možností, proč kadmium nezpůsobuje při inkubaci s thylakoidními membránami degradaci chlorofylu, může být zadržení kademnatých iontů membránovými proteiny. Kadmium se pak k chlorofylu nedostane. Jiným důvodem může být to, že podmínky pro reakci mezi kadmíem a chlorofylem jsou vhodnější v prostředí organického rozpouštědla (v našem případě v methanolu) než ve vodném roztoku thylakoidních membrán.

Jiná situace nastává, přidáme-li se kadmium již k rozpuštěnému chlorofylu. V tomto případě způsobuje degradaci chlorofylu na feofytin. Z uvedených grafů je zřejmé, že již nejnížší koncentrace  $\text{Cd}^{2+}$  (0,0225M) vede k úplné feofytinizaci, není vidět plynulý přechod od chlorofylu k feofytinu (viz obr. 4.4). Takže pravděpodobně už velmi malé množství kadmia stačí k tomu, aby se veškerý chlorofyl přeměnil na feofytin. Při vlnové délce 666 nm, při které se obvykle měří absorbance (a z té počítá koncentrace) chlorofylu *a*, kleslo zdánlivě množství pigmentu až na 41% původního množství chlorofylu (viz tab. 4.1). Posun v absorpčním spektru chlorofylu směrem k feofytinu (přestože třeba jen částečný) jsem však zaznamenala i u pigmentového extraktu ze suspenze thylakoidních membrán inkubovaných s kadmíem. K tomu mohlo dojít nedokonalým odmytím kademnatých iontů, jejichž stopové množství jsem následně i se suspenzí thylakoidních membrán rozpustila v methanolu. Kademnaté ionty, přestože ve velmi nízké koncentraci, pak pravděpodobně způsobily degradaci určitého množství chlorofylu na feofytin.

Otázkou zůstává, jakým mechanismem feofytinizace způsobená kademnatými ionty probíhá. O změnách v absorpčním spektru chlorofylu *a* v souvislosti s  $\text{Cd}^{2+}$  literatura nic neuvádí. Mnoho článků popisuje úbytek chlorofylu *a* po pěstování rostlin s kadmíem, většina ho ale vysvětluje poškozením některého z kroků biosyntézy chlorofylu (Surosz a Palinska, 2003; Dai a kol., 2006; Ouzounidou a kol., 1996; Wu a kol., 2002; Nováková a kol., 2004; Sanità di Toppi a kol., 2005). Některé výzkumy (na lišejníku *Xanthoria parietina*) vylučují, že by v důsledku přítomnosti kadmia mohlo docházet k feofytinizaci chlo-

rofyly, protože PHQ (feofytinizační koeficient) se v průběhu pokusů nemění. To potvrzuje hypotézu, že je-li chlorofyl vázán v membráně, kadmium se k němu nedostane. Fykobiontem v tomto lišejníku je ale řasa, nikoliv sinice (Sanità di Toppi a kol., 2005). Degradace chlorofylu je lépe popsána pro jiné těžké kovy. Při pěstování lišejníku *Cladonia convulata* s měďnatými kationty byl také pozorován pokles koncentrace chlorofylu *a* (tento lišejník obsahuje chlorofyl *a* i *b*) přímo úměrný zvyšující se koncentraci mědi. Také se zmenšil poměr chlorofylu *a/b*, celkové množství chlorofylu (*a + b*) se ale v průběhu pokusu nezměnilo. Z toho autoři usoudili, že chlorofyl *a* se pravděpodobně mění na chlorofyl *b* oxidací methylové skupiny na druhém kruhu tetrapyrolového jádra (Sanità di Toppi a kol., 2005). Podobné působení kadmia na fotosyntetické pigmenty sinice *Synechococcus elongatus* mohou vyloučit. Za prvé neobsahuje tato sinice na rozdíl od lišejníku *Cladonia convulata* chlorofyl *b*. Za druhé levý vrchol v absorpčním spektru chlorofylu *b* leží napravo od levého vrcholu chlorofylu *a*. Levý vrchol v absorpčních spektrech mých vzorků se posouval na druhou stranu (viz výsledky).

Feofytinizace chlorofylu způsobená těžkým kovem byla pozorována u niklu. Po sedmi dnech působení 1mM Ni<sup>2+</sup> na krásnoočko *Euglena gracilis* zbylo jen 17 % z celkového původního množství chlorofylu (*a + b*), přibýlo velké množství feofytinu a zelená krásnoočka zhnědla. Autoři práce se ale domnívají, že za feofytinizaci chlorofylu není nikl zodpovědný přímo. Nikl, podobně jako ostatní těžké kovy – i kadmium (Astolfi, Zucchi, Passera, 2004), mění permeabilitu buněčných membrán, což vede k okyselení intracelulárního prostoru. Je známo, že chlorofyl v prostředí s nízkým pH degraduje na feofytin (Eijkelhoff a Dekker, 1997; Riemann, 1977).

## Literatura

Astolfi S., Zucchi S., Passera C. (2005) Effect of cadmium on H<sup>+</sup>ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Sci.* 169: 361-368

Antolíková E. (2007) Změny ve fotosyntetickém aparátu kukuřice vlivem kadmennatých iontů. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta 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., Klobus G. (2004) Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica* 42 (4): 505-510

Clemens S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486

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

Dong J., Wu F., Zhang G. (2005) Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *J Zhejiang Univ SCI* 6B (10): 974-980

Eijkelhoff C., Dekker JP. (1997) A routine method to determine the chlorophyll *a*, pheophytin *a* and  $\beta$ -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynth. Res.* 52: 69-73

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

Faller P., Kienzler K., Krieger-Lizskay A. (2004) Mechanism of Cd<sup>2+</sup> toxicity: Cd<sup>2+</sup> inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca<sup>2+</sup> site. *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 158-164

Heckathorn SA., Mueller JK., La Guidice S., Zhu B., Barret T., Blair B., Dong Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal

stress. Am. J. Bot. 91(9): 1312-1318

kolektiv autorů (2001) Cadmium (CAS No. 7440-43-9) and cadmium compounds. U.S. Department of Health and Human services, Report on Carcinogenes, 11 edition

Král'ová K., Masarovičová E., Lešíková J., Ondrejkočičová I. (2005) Effects of Cd(II) and Zn(II) complexes with bioactive ligands on some photosynthesizing organisms. Chem. Pap. 60 (2): 149-153

Manankina E., Melnikov S., Budakova EA., Shalygo NV. (2001) Effect of Ni<sup>2+</sup> on early stages of chlorophyll biosynthesis and pheophytinization in *Euglena gracilis*. Russ. J. Plant Physiol. 50 (3): 390-394

Mendoza-Cozatl D., Rangel-González E., Moreno-Sánchez R. (2006) Simultaneous Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup> uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51: 521-528

Mendoza-Cozatl D., Moreno-Sánchez R. (2005) Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta 1706: 88-97

Mendoza-Cozatl D., Devars S., Loza-Tavera H., Moreno-Sánchez R. (2002) Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiol. Plant. 115: 276-28

Nováková M, Matějová E., Sofrová D. (2004) Cd<sup>2+</sup> effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.). Photosynthetica 42 (3): 425-430

Otero S., Nunez-Olivera E., Mertínez-Abaigar J., Tomás R., Arróniz-Crespo M, Beaucort N. (2006) Effects of cadmium and enhanced UV radiation on the physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *cordifolia*. Photochem. Photobiol. Sci. 5: 760-769

Ouzounidou G., Moustakaz M., Elefetheriou LP. (1996) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32: 154-160

Pavlová (2006) osobní sdělení

Pavlovič K., Masarovičová E., Král'ová K., Kubová J. (2006) Response of chamomile plants (*Matricaria recutita* L.) to cadmium treatment. Bull. Environ. Contam. Toxicol.

Prasad MNV. (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* 35(4): 525-545

Riemann B. (1997) Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural populations of phytoplankton. *Limnol. Ocean.* 23(5): 1059-1066

Rutherford W., Faller P. (2001) The heart of photosynthesis in glorious 3D. *Trends Biochem. Sci.* 26(6): 341-344

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

Sanità di Toppi L., Gabrielli R. (1998) Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41: 105-130

Surosz W., Palinska KA. (2003) Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 40-48

Sviteková L. (2006) Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát sinice *Synechococcus elongatus*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha

Šetlík, Seidlová, Šantrůček

[http://kfar.bf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220\\_04.pdf](http://kfar.bf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_04.pdf)

Wei S., Zhou Q., Koval P. (2006) Flowering stage characteristics of cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their significance to phytoremediation. *Sc. Tot. Environ.* 369: 441-446

Wu F., Zhang G., Dominy P. (2002) Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 50: 67-78

Xiong J., Subramanin S., Govindjee (1996) Modeling of the D1/D2 proteins and co-factors of the photosystem II reaction center: Implications for herbicide and bicarbonate binding. *Protein Sci.* 5: 2054-2073

Zhou W., Juneau P., Qui B. (2006) Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. *Chemosphere* 65: 1738-1746