

Přírodovědecká fakulta University Karlovy
Katedra anatomie a fyziologie rostlin



***Studium detoxikace nitrosloučenin tkáňovými
kulturami rostlin***

Doktorská disertační práce

Mgr. Radka Podlipná

Školitel: RNDr. Tomáš Vaněk, CSc.

Praha 2006

Práce byla vypracována s podporou následujících projektů a grantů:

- COST – Plant biotechnology for removal of organic pollutants and toxic metals from wastewater and contaminated soils. No. COST 837.10 (1998-2003) T. Vaněk
- Theoretical and practical aspects of TNT phytoremediation. Bilateral cooperation Czech-Germany No. CZE 01/024 (WASAG DECON GmbH) (2001-2004), T. Vaněk
- Studies of phytoremediation of explosives by tissue cultures of higher plants. Grant Agency CR, No. 206/99/1252, (1999-2001) T. Vaněk
- Plant tissue cultures as a model system for studies of phytoremediation of radionuclides released into the environment, Grant Agency AS, No. A6055902, (1999-2002) T. Vaněk
- Radiophytoremediation and radiophytomonitoring, Grant Agency AS, No. S S4055014, (2000-2004), T. Vaněk PhytoDec, EU project EVK1-CT-1999-00024, 2002-2004, T. Vanek
- COST 859 "Phytotechnologies to promote sustainable land use management and improve food chain safety" 2005 – 2009, vice-chairman T. Vaněk
- Study of enzymes participating in degradation of TNT. Grant Agency CR, No. 206/02/P065, (2002-2004) A. Nepovím
- Teoretické a praktické aspekty fytoremediace TNT, Kontakt ME 493, 2002 – 2004, T. Vaněk
- Studies of the key enzyme in phytoremediation of explosives. Grant Agency CR, No. 206/99/P034, (1999-2001) A. Nepovím

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Vaňkovi, CSc. za odborné vedení a neúnavnou pomoc po celou dlouhou dobu mého studia. Dále děkuji RNDr. Aleši Nepovímovi, Ph.D. za všestrannou pomoc a celému současnému i bývalému osazenstvu Oddělení rostlinných explantátů Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za přátelskou a tvůrčí atmosféru na oddělení. Vřelý dík patří též celé rodině za trpělivost a podporu, které se mi od ní dostávalo.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	5
----------------------	---

1 TEORETICKÁ ČÁST9

1.1 ROSTLINY A STRES.....	10
---------------------------	----

1.2 XENOBIOTIKA A JEJICH METABOLISMUS.....	10
--	----

1.3 NITROLÁTKY.....	16
---------------------	----

1.3.1 Základní fyzikální a chemické vlastnosti TNT.....	18
---	----

1.3.2 Základní fyzikální a chemické vlastnosti DNT.....	19
---	----

1.3.3 Základní fyzikální a chemické vlastnosti nitroesterů.....	20
---	----

1.3.4 Kontaminace prostředí výbušninami.....	22
--	----

1.3.5 Toxicita nitrosloúčenin.....	23
------------------------------------	----

1.3.5.1 Fytotoxicita nitrolátek.....	25
--------------------------------------	----

1.4 METABOLISMUS NITROLÁTEK.....	26
----------------------------------	----

1.4.1 Mikroorganismy.....	27
---------------------------	----

1.4.2 Houby.....	29
------------------	----

1.4.3 Vyšší rostliny.....	31
---------------------------	----

1.4.3.1 Příjem a distribuce.....	31
----------------------------------	----

1.4.3.2 Transformace.....	32
---------------------------	----

1.4.3.2.1 Redukce.....	32
------------------------	----

1.4.3.2.2 Oxidace.....	34
------------------------	----

1.4.3.2.3 Konjugace.....	35
--------------------------	----

1.4.3.2.4 Metabolismus alifatických nitrosloúčenin.....	36
---	----

1.4.4 Enzymy účastníci se degradace nitrolátek.....	37
---	----

1.4.4.1 Nitroreduktasy.....	38
-----------------------------	----

1.4.4.2 Oxygenasy.....	39
------------------------	----

1.4.4.3 Peroxidasy.....	40
-------------------------	----

1.4.4.4 Glutathion-S-transferasy.....	41
---------------------------------------	----

1.4.4.5 Glykosyltransferasy.....	41
----------------------------------	----

1.5 FYTOREMEDIACE.....	42
------------------------	----

1.5.1 Fytoextrakce.....	44
-------------------------	----

1.5.2 Rhizofiltrace.....	47
--------------------------	----

1.5.3 Fytovolatilizace.....	48
-----------------------------	----

1.5.4	<i>Fytostabilizace</i>	48
1.5.5	<i>Fytodegradace</i>	49
1.5.6	<i>Fytoremediace výbušnin</i>	50
1.5.7	<i>Výhledy</i>	51
2	CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	53
3	MATERIÁL A METODY	55
3.1	<i>ROSLINNÝ MATERIÁL</i>	56
3.1.1	<i>Rostliny kultivované in vitro</i>	56
3.1.2	<i>Kultury pěstované hydroponicky</i>	65
3.1.3	<i>Rostliny kultivované in vivo</i>	67
3.2	<i>METODY</i>	71
3.2.1	<i>Stanovení růstového koeficientu</i>	71
3.2.2	<i>Test inhibice elongace kořene hořčice bílé</i>	71
3.2.3	<i>Stanovení obsahu nitrosloučenin a nitroesterů ve vzorcích</i>	72
3.2.3.1	<i>-pomocí HPLC</i>	72
3.2.3.2	<i>-spektrofotometrickou metodou (Oh a kol., 2000)</i>	73
3.2.4	<i>Izolace proteinů</i>	73
3.2.4.1	<i>Příprava hrubého extraktu a precipitace</i>	73
3.2.4.2	<i>Iontoměničová chromatografie</i>	74
3.2.4.3	<i>Stanovení koncentrace bílkovin</i>	74
3.2.4.4	<i>Stanovení nitroreduktázové aktivity</i>	75
3.2.4.5	<i>SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)</i>	75
3.2.4.6	<i>Gelová sloupcová chromatografie</i>	76
3.2.4.7	<i>Dvoudimenzionální elektroforéza</i>	77
3.2.5	<i>Sledování distribuce ¹⁴C –TNT v rostlině</i>	78
3.2.6	<i>Konstrukce umělých mokřadů</i>	79
3.2.6.1	<i>Stanovení dusičnanů</i>	81
4	VÝSLEDKY	83
1.1.	<i>PŮSOBENÍ TNT A DNT NA RŮST ROSTLIN</i>	84
1.1.1.	<i>Vliv TNT a DNT na klíčení a růst kulturních plodin</i>	84
1.1.2.	<i>Vliv DNT na klíčení kulturních plodin v laboratorních podmínkách</i>	86

1.1.3. Vliv různých koncentrací TNT na růst suspenzních kultur topolu černého a mydlice lékařské	87
1.2. DEGRADAČNÍ STUDIE	89
1.2.1. Degradace TNT hydroponicky pěstovanými slunečnicemi.....	89
1.2.2. Degradace TNT in vitro kulturou regenerantů hybridu topol osika a topolu černého	92
1.2.3. Degradace TNT suspenzní kulturou mydlice lékařské	94
1.2.4. Degradace TNT suspenzní kulturou konopí setého	95
1.2.5. Metabolismus produktů degradace TNT.	97
1.2.6. Degradace DNT in vitro kulturou regenerantů starčku přímětníku.....	98
1.2.7. Degradace DNT suspenzní kulturou mydlice lékařské.....	99
1.2.8. Degradace TNG in vitro kulturou regenerantů sítiny.	101
1.2.9. Degradace TNG suspenzní kulturou lnu.	102
4.1 TOXICITA NITROSLOUČENIN A JEJICH DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ	104
1.3. ENZYMOVÉ STUDIE	111
1.3.1. Indukce exprese proteinů s nitroreduktázovou aktivitou.....	111
4.1.1 Izolace enzymu zodpovědného za první krok redukce TNT.....	113
4.2 DISTRIBUCE RADIOAKTIVITY V PRŮBĚHU DEGRADACE [¹⁴ C] TNT.....	122
1.3.2. Distribuce radioaktivity v průběhu degradace [¹⁴ C] TNT in vitro kulturou regenerantů starčku přímětníku.....	122
1.3.3. Distribuce radioaktivity v průběhu degradace [¹⁴ C] TNT suspenzní kulturou mydlice lékařské	126
4.3 STUDIUM FYTOREMEDIACE NITROSLOUČENIN IN SITU.	127
1.3.4. Odbourávání nitroesterů v modelové čistírně odpadních vod.	127
1.3.5. Konstrukce umělého mokřadu.	134
1.3.6. Odbourávání nitroesterů z odpadní vody v laboratorních podmínkách.....	137
5 DISKUSE.....	139
5.1 VLIV NITROSLOUČENIN NA RŮSTOVÉ CHARAKTERISTIKY ROSTLIN A IN VITRO KULTUR.....	140
5.2 DEGRADAČNÍ STUDIE	142
5.3 TOXICITA NITROLÁTEK A JEJICH DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ.....	144
5.4 IZOLACE ENZYMU S NITROREDUKTASOUVOU AKTIVITOU	145
5.5 FYTOREMEDIACE NITROESTERŮ IN SITU	148
6 ZÁVĚRY	151

7 POUŽITÁ LITERATURA..... 155

SEZNAM ZKRATEK

¹⁴ C-TNT	radioaktivně značený trinitrotoluen
2,4- D	kyselina dichlorfenoxyoctová
2-ADNT	2-amino-4,6-dinitrotoluen
4-ADNT	4-amino-2,6-dinitrotoluen
AA mix	44 % akrylamid
ADNT	aminodinitrotoluen
ANT	aminonitrotoluen
APS	persulfát amonný
BAP	6-benzylaminopurin
BCB	Brilliant Coomassie Blue
DANT	diaminonitrotoluen
DEAE	2[-(Diethylamino)ethyl]
DEGN	diethylenglykoldinitrát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	dinitroanilin
DNG	dinitroglycerin
DNT	dinitrotoluen
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGDN	nitroglykol
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
GT	glykosyltransferasa
GV	růstový koeficient (growth value)
HADNT	hydroxylaminodinitrotoluen
HMX	octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin
HPLC	kapalinová chromatografie za vysokých tlaků (high performance liquid chromatography)
IPG	immobilized pH gradient
KIN	kinetin

LA	azid olova
LP	pikraminát olova
LT	trinitroresorcinát olova
MF	fulminát rtuti
MNG	mononitroglycerin
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS medium	medium dle Murashige a Skooga (1962)
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukovaná forma
NC	nitroceluosa
OYE	Old Yellow Enzyme
PAHs	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PETN	pentaerytritoltetranitrát
PVP	polyvinylpyrrolidon
RDX	hexahydro-1,3,5,-trinitro-1,3,5-triazin (Rooyal Demolition Explosive)
SAVO	komerčně vyráběný desinfekční prostředek obsahující chlornan sodný (5 %)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SF	ulminát stříbra
TAT	2,4,6-triaminotoluen
TCE	trichlorethylen
TDZ	thiadizuron
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TNB	trinitrobenzen
TNF	trinitrofenol
TNG	trinitroglycerin
TNR	trinitroresorcin
TNT	2,4,6-trinitrotoluen

TRIS

Tris(hydroxymethyl)aminomethane

1 Teoretická část

1.1 ROSTLINY A STRES

Rostliny osídlily téměř všechny oblasti Země, včetně oceánů a vnitrozemských vod; na souši je můžeme nalézt i na tak nehostinných místech jakými jsou pouště a ledovce. Důsledkem rozmanitosti přirozeného prostředí je pak nutnost se vyrovnat se stresem způsobeným vnějším prostředím jako je sucho, zasolení nebo s extrémní v teplotě, v osvětlení, v přísunu CO₂ nebo vody či přítomností těžkých kovů, reaktivních forem kyslíku nebo jiných nebezpečných chemických látek. Stresové faktory ať už biotické či abiotické mají na různé druhy různý účinek, což je dáno rozmanitostí ochranných mechanismů v rostlinné říši. Silná kutikula, výrazná impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody atd. jsou příkladem pasivní dlouhodobé ochrany rostliny. Jinou z možností obrany proti stresu je také správné načasování rozmnožovacího cyklu.

Další velmi důležitou strategií ochrany rostlin je aktivní odpověď ihned po setkání se stresorem. Tehdy dochází ke spuštění řetězce biochemických změn a syntéze specifických metabolitů, které zvyšují odolnost rostliny vůči působícím faktorům. Tento děj je však energeticky náročný a tak při dlouhodobém působení stresoru dochází k vyčerpání organismu.

Dlouhodobým působením stresoru je vytvářen silný selekční tlak, který postupně vede k molekulárním, biochemickým a fyziologickým změnám trvalého charakteru. Adaptace rostlin na extrémní podmínky jim umožnily stát se dominantní společností, na kterém jsou ostatní živé organismy existenčně závislé.

1.2 XENOBIOTIKA A JEJICH METABOLISMUS

Rostliny jsou trvale vystaveny vlivu toxických látek v prostředí, které přijímají z půdy i z ovzduší. Některé toxické látky jsou produktem samotných rostlin a působí jako obranný mechanismus proti predátorům, mikrobiální infekci či proti jiným rostlinným druhům. Rozvoj vědy a techniky však zapříčinil vznik obrovského množství látek, které nemají přirozený původ v přírodě, ale byly uměle vytvořeny člověkem. Všechny tyto látky, které vstupují do těla rostlin, ale které rostlina nemůže využít ani jako zdroj energie ani jako prekurzor pro výstavbu vlastních biomolekul označujeme jako tzv. xenobiotika (K. Hatzios, 1997). Každé xenobiotikum představuje pro organismus potenciální nebezpečí, a proto prvořadou snahou každého organismu je eliminovat vliv těchto látek na vlastní organismus (Hannink a kol., 2002)

V průběhu fylogenetického vývoje se obecnými evolučními procesy vyvinuly mechanismy umožňující do jisté míry chránit organismy před působením xenobiotik. Účinky jednotlivých xenobiotik na rostlinný organismus jsou dány chemickou podstatou působící látky a její koncentrací a délkou jejího působení. Strategie obrany se liší v závislosti na struktuře dané látky, tedy na jejím chování vůči buňce, zejména biologickým membránám. Látky, které samovolně neprojdou přes plasmatickou membránu (nejčastěji látky polární, hydrofilní povahy), jsou pro rostlinu méně nebezpečné, neboť buňka je schopna vzhledem k hydrofobní podstatě buněčných membrán regulovat jejich příjem. Na druhé straně nepolární, lipofilní látky mohou samovolně přejít přes plasmatickou membránu či membrány organel. Mnohá lipofilní xenobiotika se tak mohou akumulovat v rostlinných tkáních a zde reakcí s proteiny, nukleovými kyselinami nebo jinými biomolekulami ovlivňovat endogenní metabolismus buňky, což může způsobit nevratná poškození (Blake-Kalff, 1997). V této situaci se buňka snaží vypořádat s přítomností xenobiotika mechanismy souhrnně zvanými detoxikační reakce. Těmto procesům byla vždy věnována velká pozornost zejména u živočichů a člověka, protože znalost metabolismu xenobiotik je důležitá nejen z hlediska toxikologického, ale i z hlediska farmakologického. Od sedmdesátých let 20. století se v souvislosti s rozšířením herbicidů a pesticidů studuje metabolismus xenobiotik také v rostlinách. Stále však platí, že zatímco u člověka a experimentálních zvířat jsou metabolické cesty odbourávání řady xenobiotik dobře prozkoumány, u rostlin jsou informace o přeměně cizorodých látek stále nedostačující.

Poškození rostlin chemickým stresem se projevuje četnými příznaky jako jsou hromadění cizorodých látek a jejich metabolitů v rostlině, změny pH na povrchu rostliny a v pletivech, inhibice či aktivace určitých enzymů, zvýšený obsah sloučenin obsahujících SH-skupiny (např. glutathion) a fenolů, snížená hladina kyseliny askorbové v listech, snížení fotosyntézy, zvýšení respirace, snížená produkce sušiny, změny v propustnosti buněčných membrán, poruchy vodního provozu, apod. Při dlouhodobé zátěži se přechodné poruchy metabolismu vyvinou až v chronické poškození s nevratnými důsledky. Jejich dopad na rostliny bývá zvýšen i kombinací toxických látek a jiných stresových faktorů. Citlivost k různým polutantům je druhově specifická (Larcher, 2003).

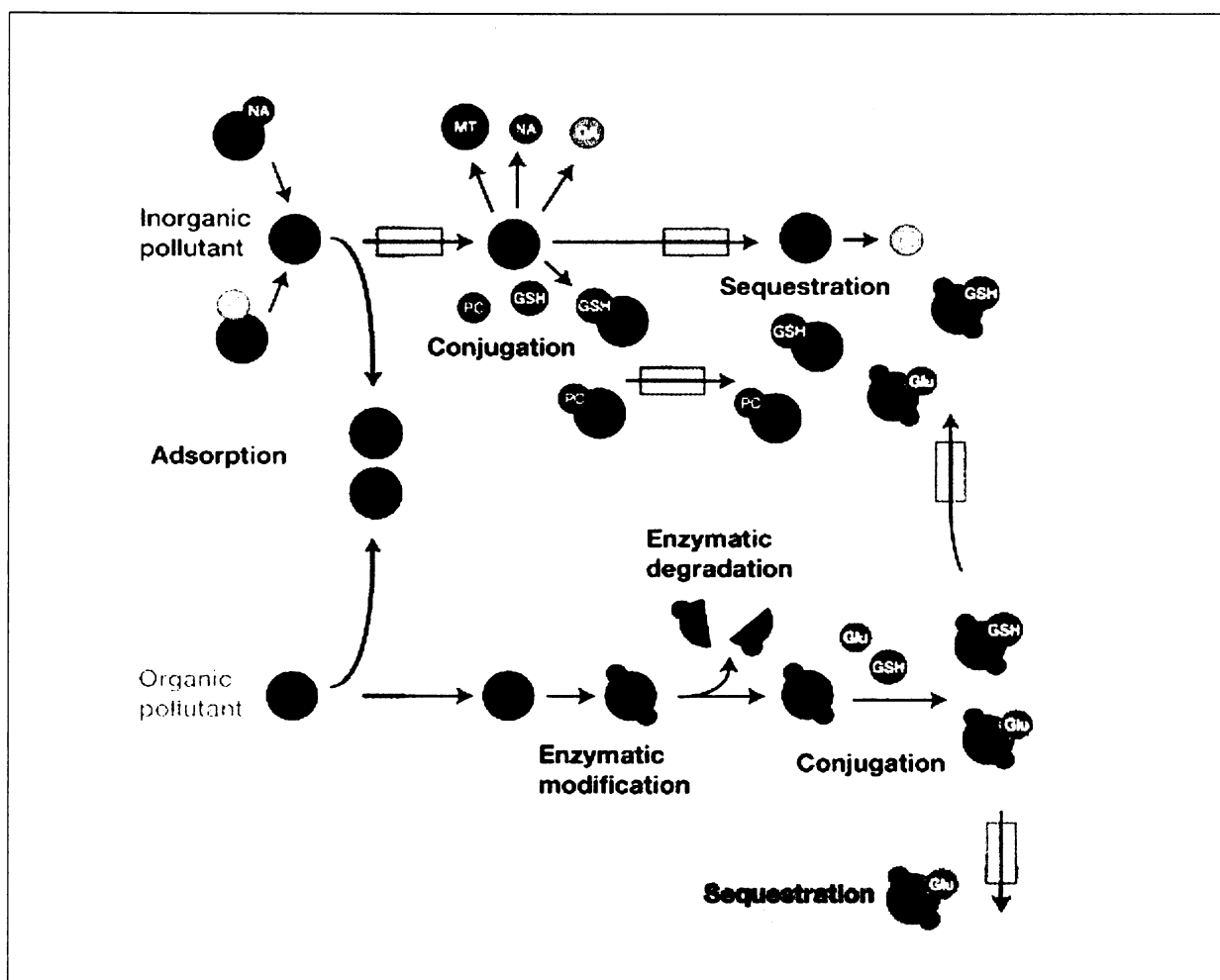
Mezi nejvýznamnější polutanty patří:

- těžké kovy
- herbicidy a pesticidy
- PCB

- ropné produkty
- nitroaromatické látky a jiné výbušniny

U živočichů dochází k metabolismu xenobiotik ve třech fázích. V první fázi enzymy oxidují, redukují nebo hydrolyzují xenobiotikum, čímž zavádějí nebo odkrývají reakční skupiny, které později usnadňují jeho konjugaci s endogenními sloučeninami (např glutathion, glukuronát, aminokyseliny apod). Ve třetí fázi jsou hydrofilní konjugáty transportovány z buňky pomocí proteinových přenašečů a následně vylučovány v moči nebo výkalech. Ačkoli určitou schopnost biotransformovat xenobiotika vykazují prakticky všechny tkáně a orgány, hlavní detoxikační orgán živočichů představují játra.

U rostlin můžeme metabolismus xenobiotik také rozdělit do tří obdobných fází jako u živočichů, přestože rostliny nemají skutečnou efektivní cestu vylučování (*Obr. 1*). Rostliny se podobají játrům svou schopností metabolisovat široké spektrum xenobiotik od vysoce polárních k nepolárním, díky tomu se někdy nazývají "green liver" planety (Sandermann, 1992).



Obr.1. Schéma metabolismu xenobiotik u rostlin (Pilon-Smits, 2005). GSH:glutathion, Glu: glukosa, MT: metallothioniny, NA: nikotiamin, OA: organické kyseliny, PC: fytochelatiny

Fáze I u rostlin zahrnuje nesyntetické procesy jako jsou oxidace, redukce nebo hydrolýza. Výsledkem Fáze I v metabolismu xenobiotik v rostlinách jsou metabolity - látky se sníženou nebo modifikovanou fytotoxicitou, zvýšenou polaritou a připravené pro další procesy. Nejdůležitějšími enzymy této fáze jsou cytochromy P-450 (CYP) a esterasy. Rostlinné CYP jsou multifunkční enzymy, které se vyskytují v mnoha isoformách (řádově tisíce), katalyzují velké množství odlišných reakcí a vykazují relativně nízkou jak tkáňovou, tak substrátovou specifitu. Ačkoliv se problematikou regulace a exprese CYP zabývá poslední dobou mnoho vědeckých týmů, stále nebylo objasněno, jak jsou CYP regulovány, ani kolik se jich účastní biotransformace xenobiotik (Reichhart a kol., 1998; Stiborová a kol., 2000).

Fázi II metabolismu xenobiotik představují syntetické reakce - konjugace. Již před více než patnácti lety bylo dokázáno, že rostliny obsahují konjugační enzymy, které se

podobají v mnoha kriteriích enzymovým systémům savců. Druhé fáze se zúčastňují především glutathion-S-transferasy a glukosyltransferasy, ale také UDP-glukuronyltransferasy (Pflugmacher, 1998). Ve druhé biotransformační fázi jsou většinou tvořeny látky s velmi sníženou nebo již žádnou fyto toxicitou.

Významnou reakcí druhé fáze je konjugace s glutathionem. Tripeptid glutathion je nukleofilní sloučenina, která se kovalentně váže na mnohá elektrofilní xenobiotika. Reakce bývá katalyzována glutathion-S-transferasou (GST), ale může probíhat i spontánně. Konjugáty s glutathionem vznikají v cytosolu, ale v tomto v tomto buněčném kompartmentu se neakumulují, protože funkce glutathion-S-transferasy je inhibována produktem. Nepovím a kol. (2004) sledoval vliv stresu způsobeného přítomností těžkých kovů (železo a nikl) a nitroaromatických sloučenin (TNT, DNT, ADNT, DANT) na aktivitu GST v „hairy root“ kultuře křene. Těžké kovy způsobovaly inhibici GST aktivity, zatímco nitroaromatické sloučeniny v 1mM koncentraci aktivitu GST zvyšovaly.

Jestliže xenobiotikum obsahuje fenolovou, arylaminovou, thiolovou nebo karboxylovou skupinu, může dojít k jeho glykosylaci - nejčastěji glukosou. Tyto reakce jsou katalyzovány příslušnými glukosyltransferasami. Pflugmacher a Sandrmann (1998) v rozsáhlé studii konjugátů několika xenobiotik prokázali konstitutivní glukosyltransferasovou aktivitu u všech typů vyšších i nižších rostlin. Zároveň prokázali rozdílnou hodnotu aktivity enzymů mezi jednotlivými rostlinnými druhy. Glykosidicky se mohou vázat i jiné cukry (arabinoza, xyloza).

Pro efektivnost detoxikace je velmi důležitá třetí fáze – kompartmentace. Ve fázi III jsou konjugáty transformovány na sekundární konjugáty nebo na nerozpustná rezidua, která mohou být uskladněna. Běžnou reakcí této fáze je N-malonylace glutathionových nebo glukosydických konjugátů vzniklých během fáze II. Připojení malonátu je pravděpodobně signálem pro transport konjugátů přes tonoplast do vakuoly nebo přes plazmatickou membránu do apoplastu, kde jsou uskladněny (Schroder a Collins, 2002).

Již dříve byly objeveny membránově vázané transportéry zprostředkovávající energeticky dependentní export xenobiotik do vakuoly. Skupina proteinů, které se na přenosu organických polutantů přes membrány podílejí, se nazývají „Multi Drug Resistance Proteins (MRPs) a náleží do skupiny ABC (ATP Binding Cassette) transportérů. Jejich role byla nejprve popsána u živočišném organismu, ale dnes se jedná i o jednu z nejlépe prostudovaných skupin rostlinných transportních proteinů. ABC transportéry jsou zodpovědné za příjem, transport a ukládání celé škály vysokomolekulárních látek, ať už se jedná o toxické produkty vlastního metabolismu nebo xenobiotika (Tommasini a kol., 1998;

Liu a kol., 2001). Přesné určení role jednotlivých transportérů není jednoduché, neboť mnoho transportérů funguje simultánně, jejich aktivita je různá podle toho v které rostlinné tkáni působí a existuje obrovské množství potenciálních substrátů. Nejpokročilejší jsou v tomto ohledu experimenty na rostlinném druhu *Arabidopsis thaliana*. Lu u této rostliny popsal transportéry AtMRP2, které transportují do vakuoly glutathionové konjugáty a chlorofylové katabolity, ale netransportují žlučové kyseliny, AtMRP1, které mohou transportovat glutathionové konjugáty xenobiotik a endogenní toxické látky včetně herbicidů a anthokyanů, a AtMRP3, které transportují glutathionové konjugáty kadmia . Ve vakuole pak pomocí peptidas dochází k degradaci glutathionových částí (Lu a kol., 1997 a 1998).

Rostlinné druhy, rostoucí dlouhodobě na stanovišti s vysokou koncentrací toxických látek, si vytvořily řadu mechanismů zabraňujících negativním účinkům těchto látek na rostlinný organismus (Cobbett a Meagher, 2002). Nejlépe známe jsou adaptace rostlin na vysoké koncentrace těžkých kovů. Termínem těžké kovy jsou označovány kovy, jejichž specifická hmotnost je vyšší než 5 g.cm^{-3} . Z ekotoxikologického hlediska se většinou jedná o kovy, u kterých je určitá koncentrace nebezpečná pro ostatní živé organismy a termín těžké kovy je synonymem pro kovy toxické. Jedná se především o měď, zinek, kadmium, rtuť, olovo, chrom, mangan, železo, nikl, arsen a selen, přičemž některé z těchto kovů jsou ve stopových množstvích esenciální, tj. pro život nezbytné jako např. měď, zinek nebo chrom. Těžké kovy jsou přesto v určité koncentraci toxické pro jakýkoliv organismus (Verma a kol., 2003; L'Azou a kol., 2002). Jejich toxicita spočívá ve vysoké afinitě kovů k chemickým skupinám obsahujícím redukované formy síry, takže inaktivují enzymy s volnými $-SH$ skupinami. Zvýšená koncentrace těžkých kovů v rostlinách může mít za následek porušení membránových systémů, inhibici enzymů, produkci volných kyslíkových radikálů a inaktivaci elektrontransportních řetězců (Larcher, 2003). Mechanismy adaptace zahrnují:

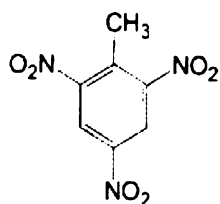
1. Imobilizaci toxických iontů v buněčné stěně a transport apoplastem jako prevence kontaktu s protoplastem
2. Zabránění průchodu plazmalemou
3. Chelaci kovu na ligand v cytoplasmě. Následně je tento komplex kov-ligand umístěn buď subcellulárně (např. ve vakuole) nebo transportován do specifických tkání rostlin. Chelatující ligandy zahrnují: organické kyseliny jako např. citrát a malát, které chelatují $Al(III)$; některé aminokyseliny, zvláště pak histidin, metalothioneiny a fytochelatiny (Baker, 1989).

1.3 NITROLÁTKY

Nitrosloučeniny jsou látky, jejichž nitroskupina je vázána přímo na atom uhlíku. Podle počtu atomů vodíku vázaných na uhlík s nitroskupinou rozeznáváme nitrosloučeniny primární, sekundární a terciární. Nižší nitrosloučeniny jsou bezbarvé nebo nažloutlé kapaliny, nerozpustné ve vodě, rozpustné v alkoholech a v etherech. Aromatické nitrosloučeniny kromě nitrobenzenu a *o*-nitrotoluenu jsou pevné látky s charakteristickým zápachem po hořkých mandlích. Z hlediska využitelnosti jsou nejdůležitějšími: nitrobenzen, mono- a di-nitrotoluen, trinitrotoluen, tetryl, mononitrochlorbenzeny, nitroaniliny, nitronaftaleny, dinitrofenol, kyselina pikrová a nitrokresol (Urbanski, 1984). Nejčastěji jsou nitrosloučeniny používány jako výbušniny či náplně do střeliva. Rozeznáváme tři základní skupiny výbušnin:

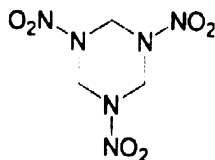
1. *nitroaromatické* - vyznačují se relativně velkou chemickou stálostí a možností dlouhého skladování, liší se od ostatních výbušnin malou citlivostí k nárazu a tření. Do této skupiny patří TNT, které je významné zejména z historického pohledu a s ohledem na nejrozšířenější kontaminaci ploch v důsledku jeho hojného používání v minulém století;
2. *nitroaminy* (RDX, HMX) - mnohem účinnější výbušniny, které se dnes nejvíce používají
3. *estery kyseliny dusičné* (PETN, TNG, nitrocelulóza) - využívané pro plnění rozbušek a roznětek (Rosenblatt, 1991) (Obr. 2).

NITROAROMATIC

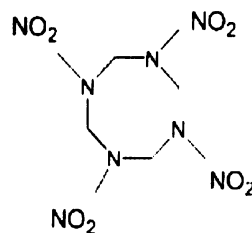


2,4,6- trinitrotoluene (TNT)

NITROAMINES

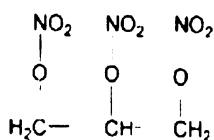


hexahydro- 1,3,5- trinitro-
1,3,5- triazine (RDX)

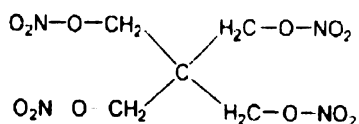


octahydro- 1,3,5,7- tetranitro-
1,3,5,7- tetrazocine (HMX)

NITRATE ESTERS



glyceroltrinitrate (GTN)

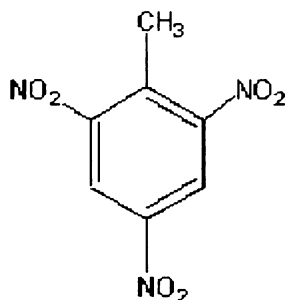


pentaerythritoltetranitrate (PETN)

Obr.2. Hlavní skupiny výbušnin (Hannink, 2002)

Nitrolátky se dále využívají i při výrobě barviv, insekticidů, textilií, plastických hmot, polyuretanových pěn, léčiv (PETN a TNG se používají jako vasodilatory při léčbě anginy pectoris), rostlinných růstových regulátorů, jako přísady do paliva (Harms a kol., 1992). Ačkoliv výroba TNT celosvětově klesá, v České republice se nevyrábí od roku 1956, stoupá výroba jiných výbušnin -DNT, TNG, RDX, HMX, PETN atd.. Nitrofenolické sloučeniny se i nadále široce využívají v zemědělství jako pesticidy.

1.3.1 Základní fyzikální a chemické vlastnosti TNT



Obr. 3. Strukturální vzorec 1,3,5 - trinitrotoluenu

Chemicky je TNT aromatický uhlovodík toluen, jehož 3 uhlíkové atomy aromatického jádra nesou namísto vodíkového atomu nitroskupinu (- NO₂), sumární chemický vzorec této sloučeniny je C₆H₂(NO₂)₃CH₃ (Obr.3.). Jedná se o nažloutlou krystalickou látku (krystalizuje v rhomboedrické soustavě ve formě sloupů nebo jehel) o hustotě 1,663 g cm⁻³ a bodu tání 80,7°C. Lze ji snadno bezpečně roztavit a vzniklá kapalina má bod varu 210 - 212 °C. Jako pevná látka se chová pouze do teploty 35°C, při zvýšení teploty se postupně stává plastickou. Současná literatura uvádí rozpustnost TNT ve vodě v poměrně širokém rozmezí 100-200 mg.dm⁻³ při pokojové teplotě. Rozpustnost rychle klesá se zvyšujícím se pH, při značně vysokém pH byly pozorovány neznámé transformační produkty, s vyšší teplotou se rozpustnost zvyšuje (6°C- 42°C) (Ro, 1996). Dobře se však rozpouští ve většině běžných organických rozpouštědel kromě ethanolu a sirouhlíku. Je zajímavé, že je velmi dobře rozpustný v kyselině sírové, vůči níž je stálý až do teplot nad 150°C. Působením bazických sloučenin však přechází do nestabilních forem, (tzv.trytoláty), které se vyznačují velmi snadnou výbušností. Při manipulaci s TNT je proto nutno zabezpečit, aby se nedostal do styku s alkalickými látkami za zvýšené teploty. První zprávy o trinitrotoluenu se objevují v roce 1863. Tuto látku připravil Wilbrand působením směsi kyseliny dusičné a sírové za teploty “blízké teplotě bodu varu”. Později Beilstein a Kuhlberg (1870) podle této práce, nejrozsáhlejší ve své době z oboru nitrace aromatických uhlovodíků, popsali nitraci *o*-, *m*- a *p*-nitrotoluenu na trinitroderiváty. Isolovali kromě α -trinitrotoluenu také isomer γ (Urbanski, 1958). Isomery β a γ připravil z *m*-nitrotoluenu Hepp roku 1882. Strukturu isomeru α -popsali Claus a Becher (1883) a isomerů β a γ Will (1914). V době První světové války šlo o nejrozšířenější výbušninu, během druhé světové války se začaly používat i jiné výbušniny a

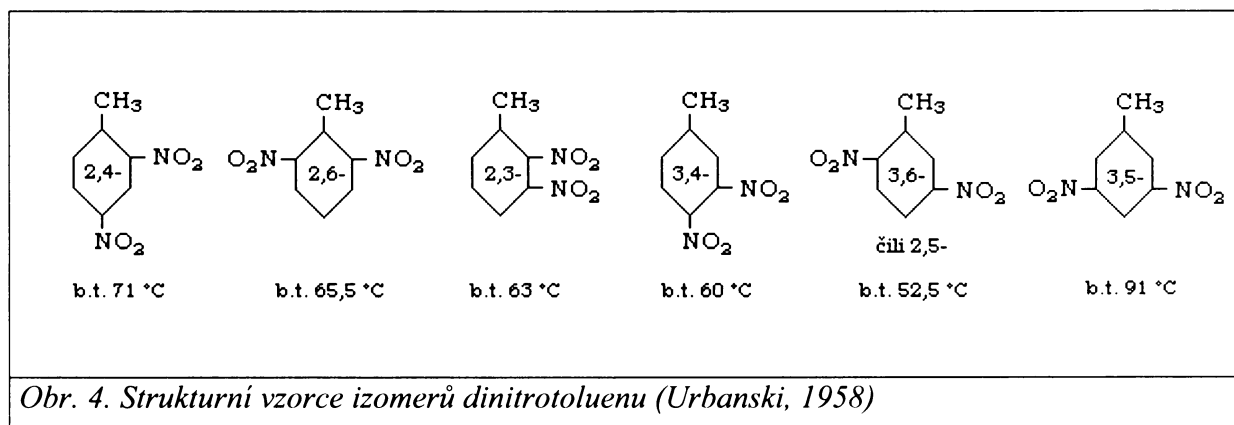
TNT byl více používán do směsí a jako náplň do nábojů (Boileau a kol., 1987).

Jako výbušnina vykazuje TNT mimořádně dobré vlastnosti - je velmi stabilní a málo citlivý vůči vnějším vlivům a přitom se vyznačuje velmi vysokou brizancí a razancí výbuchu. Je proto ideální látkou pro přípravu jak průmyslových tak vojenských trhavin. Často se přitom v různém poměru mísí s jinými explozivními látkami a setkáme se s ním mimo jiné pod obchodním názvem Permonit, Permonex, Karpatit, známé jsou i vojensky využívané Atomaly a řada dalších. Díky tomu, že jeho explozivní vlastnosti jsou velmi dobře prozkoumány, uvádí se pro vyjádření síly jaderného nebo termojaderného výbuchu ekvivalentní množství TNT v kilotunách či megatunách.

Základem výroby TNT je postupná nitrace aromatického uhlovodíku toluenu směsí kyseliny dusičné a kyseliny sírové. Ve třech krocích se postupně zvyšuje koncentrace kyseliny dusičné. Zatímco nitrace do 2. stupně (směs různých izomerů dinitrotoluenů) probíhá za relativně mírných podmínek, je pro poslední nitrační stupeň nutno použít značně drastických reakčních podmínek - nitrace probíhá obvykle ve 20 % oleu (roztok oxidu sírového v koncentrované kyselině sírové) za teplot kolem 80°C. Produkce TNT dosáhla vrcholu na konci druhé světové války, kdy se celosvětově vyrábělo 150 ktun za měsíc (Zeman, 2000)

1.3.2 Základní fyzikální a chemické vlastnosti DNT

Vzhledem je DNT žlutá amorfnní látka, překrystalovaný tvoří žluto-bílé jehlicovité krystaly (při pomalé krystalizaci značně dlouhé). Má příjemnou vůni, slabě připomínající hořkomandlovou silici. DNT je nerozpustný ve vodě, ale velmi dobře rozpustný ve většině organických rozpouštědel (aceton, toluen, benzen, ethanol aj.). Teplota tání se pohybuje v závislosti na zastoupení jednotlivých izomerů v rozmezí 47-56°C (Obr.4.).



Obr. 4. Strukturní vzorce izomerů dinitrotoluenů (Urbanski, 1958)

Všechny tyto isomery jsou slabě jedovaté, vlivem přítomnosti methylové skupiny v molekule mnohem méně než dinitrobenzen. Někteří autoři se dokonce domnívají, že hlášené otravy dinitrotoluenem jsou ve skutečnosti způsobeny přítomností nečistot, hlavně dinitrobenzenu. Dinitrotoluen (2,4-DNT) po prvé připravili Beilstein a Kuhlberg v roce 1870. Je pravděpodobné, že “dinitrobenzen” s bodem tání 71°C, připravený St. Claire Deville (1841) nitrací “nitrobenzenu” získaného z lehkého oleje, byl ve skutečnosti dinitrotoluen. Rosensthiel (1872) zjistil, že *p*-nitrotoluen poskytuje pouze jeden dinitrační produkt, isomer 2,4-, kdežto *o*-nitrotoluen mimo týž isomer dává ještě další, který autor blíže neurčil. První zmínku o tom, že existují ještě jiné isomery dinitrotoluenu, nacházíme v práci Limprichtově (1885), který mimo isomer 2,4- a 2,6- isoloval z nitračních produktů také isomer 3,6-. Podobně Zaloziacki (1903) isoloval z produktu nitrace haličské nafty dva dinitrotolueny: 2,4- a 3,6-. Beilstein a Kuhlberg (1873) připravili nitrací *m*-nitrotoluenu isomer 3,4-. Häussermann a Grell (1894) potvrdili předcházející výzkumy a zjistili, že kromě uvedených isomerů vzniká také derivát 3,5-. Při nitraci technického mononitrotoluenu, který obsahuje převážně směs *o*- a *p*-izomerů s malým (6 %) zastoupením *m*-nitrotoluenu vzniká technická směs s nejvyšším obsahem 2,4- a 2,6- izomerů DNT (Urbanski, 1958).

Samotný DNT bez přídavku dalších látek je poměrně slabá a málo citlivá výbušnina, a proto se nikdy nepoužívá samostatně. Velký význam však má jako složka směsných trhavin, nejrozšířenějšími směsmi obsahující DNT jsou ammonledkové trhaviny, dynamity, vodovzdorné trhaviny a plastické trhaviny. Protože má poměrně nízkou teplotu tání a citlivost, používá se na flegmatizaci vysoce citlivých výbušnin typu Pentrit, Hexogen, Oktogen aj. Dále se používá jako prekurzor při výrobě polyuretanových pěn a barviv.

1.3.3 Základní fyzikální a chemické vlastnosti nitroesterů

Nitroestery jsou syntetické organické látky, které se využívají především jako výbušniny. Nejvíce pozornosti si zaslouží trinitroglycerin který je nejen jednou z klíčových surovin ve výrobě trhavin, ale využívá se také v medicíně jako prostředek pro zklidnění srdečních arytmií a snižování krevního tlaku.

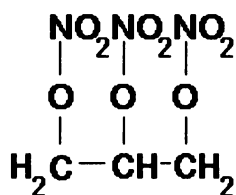
Strukturně je skupina esterů kyseliny dusičné analogická s estery kyseliny fosforečné a sírové. Na rozdíl od těchto skupin, které jsou v biosféře široce rozšířené, však

nebyly nitroestery nikdy detekovány jako sloučeniny přirozeně se vyskytující v živých organismech (Blehert a kol., 1999; White a kol., 1996)

Nitroestery nižších alkoholů jsou kapaliny s nepatrně vyšším bodem varu než mají příslušné alkoholy, a značně vyšším bodem varu než nacházíme u esterů kyseliny dusité.

Nitroestery vznikají esterifikací alkoholu kyselinou dusičnou, což je vratná exotermní reakce. Na základě experimentálních údajů ze studia esterifikační schopnosti směsí kyseliny dusičné s kyselinou sírovou se předpokládá, že esterifikačním činidlem je podobně jako při nitraci nitroniový ion NO_2^+ , a proto přítomnost kyseliny sírové v esterifikační směsi podporuje esterifikaci (Urbanski, 1958).

Nitroestery jsou silnými výbušninami. Mají větší obsah kyslíku než nitrosloučeniny, takže tepelný efekt výbušného rozkladu nitroesterů je větší než u nitrosloučenin se stejným počtem atomů uhlíku a nitroskupin. Nitroestery jako je nitroglycerin, nitroglykol, nitrocelulóza a pentrit patří proto k nejsilnějším výbušninám a výkonem předčí běžně používané nitroaromáty např. trinitrotoluen a kyselinu pikrovou.



Obr.5. Strukturální vzorec trinitroglycerinu.

Trinitroglycerin, jinak také známý pod názvy nitroglycerin a glyceryl trinitrát, je z chemického hlediska trojnásobným esterem alkoholu glycerolu s kyselinou dusičnou (Obr.5.). Je to olejovitá kapalina, v čistém stavu bezbarvá a čirá. Technický produkt je obvykle nažloutlý nebo jemně bronzově zbarvený v závislosti na čistotě výchozích surovin a podmínkách výroby. Nitroglycerin má slabě nasládlý pach, znatelný při zahřátí nad 50°C , a palčivou, nasládlou chuť. Bod tání dosahuje hodnoty $13,2^\circ\text{C}$, při teplotě $50 - 60^\circ\text{C}$ dochází za normálního tlaku k rozkladu této sloučeniny, při sníženém tlaku je bod varu uváděn přibližně kolem 180°C , při 218°C dochází k explozi.

Ve vodě je pouze málo rozpustný (přibližně 2 g.dm^{-3}), dobře se však rozpouští ve většině běžných organických rozpouštědel od alkoholů po nepolární alifatické uhlovodíky.

1.3.4 Kontaminace prostředí výbušninami

Ke kontaminaci životního prostředí dochází zejména při výrobě TNT, při které je potřeba velké množství vody na čištění, vodný odpad známý jako „red water“ obsahuje více než 30 různých nitroaromatických residuí, obdobně při naplňování a balení munice vzniká kontaminovaná tzv. „pink water“. K další kontaminaci dochází po přímé detonaci, transportu a skladování munice atd.

Protože se TNT vyrábí postupnou nitrací toluenu, jsou v kontaminacích přítomny i dinitrotolueny a nitrotolueny. Aminoderiváty, vznikající prvotní redukcí, mohou být pro životní prostředí větším problémem než původní látky, protože jsou stabilnější a mobilnější, čímž se zvyšuje riziko kontaminace povrchové i podzemní vody (Rogers, 2001).

V současné době hrají ve výrobě prim nitraminiové výbušniny jako je RDX a HMX, které mají 1,5 x vyšší výbušnou sílu než TNT. Krystalické formy obou těchto látek se získávají nitrací hexametylentetraminu nebo paraformaldehydu a dusičnanu amonného v přítomnosti anhydridu kyseliny octové (Gilbert, 1980).

V USA sama armáda přiznala kontaminaci více než 1,2 milionů tun půdy výbušninami (Hampton a Sisk, 1997; Clausen a kol., 2004), literatura hovoří o přítomnosti výbušnin a jejich metabolitů v půdě a vodách i v Německu (Bruns-Nagel a kol., 1997), v Kanadě (Cattaneo a kol., 1997), v Austrálii (Toze a kol., 1997), ve Španělsku (Duque a kol., 1993), v Argentině (Fuchs a kol., 2001) a v Anglii (Binks a kol., 1995). Rostoucí zájem v posledních letech o zdravotní a ekologická rizika vedl k intenzivnímu studiu toxicity výbušnin. U mnoha široce rozšířených explosiv byly nalezeny mutagenní účinky (Fuchs a kol., 2001; Homma-Takeda a kol., 2002; Rosenblatt a kol., 1991; Steevens a kol., 2002).

Také v České republice nalezneme velké plochy kontaminované výbušninami převážně v oblastech vojenských výcvikových prostorů, muničních skladů, dále pak v okolí současných i bývalých továren na výrobu výbušnin (*Tab.1.a 2.*). Dlouhodobým vlivem klimatických podmínek dochází ke kontaminaci povrchové i spodní vody.

Tab. 1. Současné a bývalé továrny na výrobu munice

Semtín (Explosie)	RDX, PETN, TNF, TNG, EGDN, DEGN, NC, DNT, DNC, TNR
-------------------	--

Vsetín (Zbrojovka Indet)	LA, MF, LP, LT
Vlašim (Sallier Bellot)	TNT, PETN, TNR, TNG, NC, DNT, LA, MF, SF, LT
Polička (POS)	TNT, RDX, PETN, NC, TNG, DEGN
Bojkovice (Zeveta)	TNT, RDX, NC, TNG, DEGN
Týniště nad Orlicí	TNT, RDX, NC, TNG, DEGN
Praha-Zámky (Dynamit Nobel)	TNT, TNG, EGDN, NC, DNT
Plzeň (Škoda)	TNT, TNF, NC, TNG, DEGN

Tab. 2. Vojenské výcvikové prostory

Libavá	TNT, RDX, TNG, NC, DEGN, TNF
Doupov	TNT, RDX, TNG, NC, DEGN
Ralsko-Mladá	TNT, RDX, TNG, NC, DEGN, TNF
Milovice	TNT, RDX, TNG, NC, DEGN, TNF
Boletice	TNT, RDX, TNG, NC, DEGN

1.3.5 Toxicita nitrosloučenin

Již od konce sedmdesátých let 20. století je zřejmé, že aromatické nitrosloučeniny jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí. Jsou součástí výfukových plynů a vzdušných prachových částic, zjištěny byly rovněž v říčních sedimentech. Vznikají zejména z oxidů dusíku, které jsou produkovány všemi vysokoteplotními procesy, spalováním uhlí, tepelnou likvidací odpadů, zpracováním kovů. Lokální znečištění aromatickými nitrosloučeninami je vyvoláváno úniky z provozů, kde se tyto látky zpracovávají, v malém množství vznikají nitrosloučeniny i při úpravě některých potravin grilováním. Přítomny jsou rovněž v cigaretovém kouři. Většina aromatických nitrosloučenin vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních i savčích systémech (Dilley a kol., 1982). Toxické účinky na zvířatech stejně jako na lidech způsobují hemolýzu, anémii, poškození nervového systému, gastritis a poškození ledvin (Zitting 1982). Intraperitoneálně podaný TNT (100 mg kg⁻¹) způsobil u

laboratorních potkanů poničení mozkových, jaterních a ledvinových biomembrán a buněčných organel. Morfologické studie ukázaly zničené mitochondrie, dilataci Golgiho aparátu, vakuolizaci, a akumulaci lipidových složek. Morfologické změny se týkaly především mozku a ledvin, kde TNT zvyšuje aktivitu UDP-glucuronosyltransferasy (Levine a kol., 1984). Akutní otravy mohou mít nejrůznější průběh, např. otrava tritolem se může projevit podrážděním trávicího ústrojí, bolestmi žaludku, bledostí tváří, fialováním rtů, poruchou jater, vznikem žloutenky, smrtí. Během prvních 8 měsíců První světové války bylo zaznamenáno 17000 případů otravy a 475 úmrtí v důsledku této otravy u dělníků pracujících v továrnách na výrobu TNT (Haythorn, 1920).

Nitrosloučeniny jsou odolné degradaci, protože obsahují elektrofilní místa (centra s malým elektronovým potenciálem, která jsou schopna odebírat elektronický pár k tvorbě kovalentní vazby). Takovéto látky se vážou do elektronově bohatých (nukleofilních) míst buněčných makromolekul a tak mohou vyvolávat cytotoxický nebo mutagenní efekt (Homma-Takeda a kol., 2002; Honeycutt a kol., 1996). Podíl aromatických nitrosloučenin na vývoji zhoubných nádorů v lidském organismu zatím sice nebyl prokázán jednoznačně, nicméně opodstatněnost podezření potvrzují jak epidemiologické studie u pacientů trpících nádorovým onemocněním plic, tak výskyt nádorových onemocnění u pracovníků provozů, v nichž se aromatické nitrosloučeniny vyrábějí (Stiborová, 2002).

První zmínky o silných fyziologických účincích nitroglycerinu pochází již z roku 1848 (Urbanski, 1958). Nitroglycerin patří mezi značně toxické látky a již dávky několika desítek miligramů mohou způsobit smrt člověka. Hlavním projevem jeho působení na lidský organismus je rychlé rozšiřování tepen a tím pokles krevního tlaku. Těžké otravy mohou být způsobeny vdechováním par nitroglycerinu, pronikáním pokožkou nebo sliznicemi. Projeví se bolestmi, křečemi, zmodráním sliznic, poruchami zraku a otoky. Hlavním symptomem při lehké otravě je silná bolest hlavy s pocitem bušení ve spáncích. Citlivost k působení nitroglycerinu je individuální. Dlouhodobá práce s nitroglycerinem nezpůsobuje toxické otravy, proto se z toxikologického hlediska nejedná o průmyslový jed. Metabolismus nitroglycerinu v tělech savců je poměrně dobře zdokumentován. Jedním z metabolických produktů je i oxid dusnatý, který hraje velmi důležitou úlohu nejen ve vaskulárním systému, ale i při přenosu nervového vzruchu a také v imunitním systému. Fyziologických účinků nitroglycerinu se již dávno (kolem roku 1850 se začal prodávat pod názvem Glonoin) využívá v lékařství k rychlému snižování krevního tlaku u pacientů s chorobami srdce a vysokým krevním tlakem (Akrill a kol., 2002).

RDX je uváděn v literatuře jako méně toxický než TNT, ale ovlivňuje u lidí nervový systém. RDX byl poprvé připraven v Německu Hansem Henningem v roce 1899. Není mutagenní, ale akutně toxický a to natolik, že se pro své výrazně toxické účinky na hlodavce používal jako jed na krysy (Merck, 1983). U lidí vyvolává epileptické záchvaty, takže po inhalaci nebo požití může způsobit křeče až bezvědomí (Rosenblatt, 1980). Ve vodě je stanoven přípustný limit na $105 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro člověka denní dávka 0,21 mg. Podobné, avšak značně zvýšené, účinky na nervový systém má i HMX. Relativně netoxický se zdá být PETN. Nitroaminy jsou obecně považovány za méně toxické než TNT. Pro stanovení mutagenicity a cytotoxicity použil Lachance testy na *Salmonella* a na plicních buňkách křečka čínského. V těchto testech RDX a HMX neměly na testovaný materiál žádný vliv ani při dosažení maximální koncentrace, při které jsou tyto látky rozpustné ve vodě. Testy dále prokázaly, že redukční produkty degradace TNT jsou sice méně cytotoxické než TNT, ale všechny jsou stejně jako TNT a TNB mutagenní (Lachance a kol., 1999).

1.3.5.1 Fytotoxicita nitrolátek

Fytotoxicita nitrolátek je druhově specifická a je dána zejména dostupností kontaminantu a růstovým stadiem rostliny (Hannink, 2002).

Toxicita TNT se projevuje u rostlin chlorosou a potlačením růstu (Pavlostathis 1998). Přesný mechanismus účinku není zatím znám a je předmětem intenzivního badatelského zájmu. Srovnávat publikované studie je velmi obtížné, protože jako rostlinný materiál bývají použity jednak různé rostlinné druhy a jednak jsou tyto rostliny či tkáňové kultury pěstované za různých kultivačních podmínek.

Redukční produkty TNT jsou strukturně podobné dinitroanilinovým herbicidům a mají také podobné účinky. Tyto herbicidy se vážou na konce mikrotubulů meristematických buněk, čímž zabraňují polymerizaci, která je zapotřebí k tvorbě mitotického vřeténka čímž je pozastaveno buněčné dělení (Strachan a Hess, 1983).

Ke stanovení hraniční hodnoty pro obsah TNT v půdě byl použit test založený na pozorování klíčení a růstu mladých rostlin (řepicha, brukev, oves). Toxicita TNT byla ovlivněna jak typem půdy, tak rostlinným druhem, dvouděložné rostliny byly ke koncentraci TNT více citlivé, při nízkých koncentracích 5- 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ půdy působil TNT stimulačně na jejich růst. Oves byl schopen tolerovat TNT v koncentraci překračující 1,6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ zeminy (Gong, 1999a). Scheidman (1998) studoval toxicitu TNT na 11 rostlinných druzích a došel

také k závěru, že tolerance k TNT je velmi druhově specifická. V roce 1986 publikovali Palazo a Leggett studii o vlivu TNT na hydroponicky pěstované rostliny cypřiše (*Cyperus esculentus*). Inhibiční účinek na přírůstek hmotnosti byl patrný již při koncentraci 5 mg.dm^{-3} , negativní účinky byly patrné zejména na kořenech.

Peterson (1996) se zabýval klíčením rostlin v kontaminovaném prostředí. Laboratorní pokusy ukázaly, že koncentrace TNT nad 30 mg.dm^{-3} negativně ovlivňuje klíčení semen kostřavy (*Festuca arundinacea*). K dalším studiím klíčení použil sveřep (*Bromus inermis*), u kterého došlo k redukci růstu kořínků již při koncentraci $7,5 \text{ mg.dm}^{-3}$ TNT v agarovém mediu, naproti tomu koncentrace 15 mg.dm^{-3} neměla vliv na klíčení prosa (*Panicum virgatum*). To však může být dáno i různou propustností obalů semen pro TNT (Peterson 1988). Toxické účinky TNT na kostřavě a sveřepu pozoroval i Krishnan a kol. (2000). S růstem koncentrace TNT se snižoval počet vyklíčených rostlin, jejich výška, váha, délka kořenů i sušina.

Fytotoxické účinky nitroaminů jsou velmi málo popsány, ale pravděpodobně jsou pro rostliny méně nebezpečné než TNT vzhledem k tomu, že jsou méně toxické pro člověka i většinu živočichů (Harvey 1990). Best a kol. (1997) porovnával toxické účinky RDX a TNT na suspenzní kulturu stolítku vodního. Pozoroval výraznou translokaci RDX oproti TNT, což může být považováno za důkaz jeho nižší toxicity. Lucero a kol., (1999) sledoval toxické účinky RDX a HMX na buněčnou kulturu *Datura innoxia*. Růst této kultury nebyl potlačen ani při koncentraci, která odpovídá maximální rozpustnosti ve vodě (RDX 60 mg.dm^{-3} , HMX 4 mg.dm^{-3}).

Estery kyseliny dusičné jsou látky poměrně dobře biodegradovatelné, pro zdraví člověka málo nebezpečné, a proto o fytotoxicitě nitroesterů najdeme v literatuře velmi málo informací. Základní studii provedl Goel a kol. (1997). Buněčná kultura řepy cukrovky (*Beta vulgaris*) tolerovala koncentraci 454 mg.dm^{-3} TNG. Avšak French a kol. (1999) popsal zakrnění stonků i kořínků u tabákových rostlinek klíčících na mediu s TNG v koncentraci 227 mg.dm^{-3} .

1.4 METABOLISMUS NITROLÁTEK

Elektrofilní charakter nitroskupiny ztěžuje oxidaci obvyklou pro rozklad jiných aromatických sloučenin, a to tím více čím více nitrosubstituentů je vázáno na aromatický

kruh. Tyto látky proto mnohem snadněji podléhají redukci a to jak za aerobních tak i anaerobních podmínek. Produkty této redukce jsou nezhledka více reaktivní a více karcinogenní a mutagenní než látky výchozí (Johnson, 2001).

1.4.1 Mikroorganismy

Mnoho autorů se zabývá rozkladem trinitrotoluenu (TNT) a jiných nitrosloúčenin pomocí různých bakteriálních kmenů. Za aerobních podmínek je nitroskupina typicky redukována postupnou adicí tří elektronových párů, čímž vzniká nitrososkupina, hydroxylaminoskupina a aminoskupina. Nitrosointermediáty jsou extrémně reaktivní a jsou tak příčinou toxicity nitroaromatických látek. Mikroorganismy postupně transformují TNT na amino-, diamino- a tri- amino(nitro)tolueny. Reakční rychlost klesá s redukcí elektron-deficitního atomu uhlíku. Zatím nebylo zcela prokázáno, zda tímto způsobem probíhá až úplná mineralizace (Riefler a Smets, 2002). Za aerobních podmínek dále mohou vznikat kondenzací částečně redukovaných intermediátů tetranitroazoxytolueny, které jsou biologicky inertní. Byl popsán i jiný mechanismus degradace např. u rodu *Pseudomonas sp.*, Duque (1993) popsal u těchto bakterií schopnost využívat TNT jako zdroj dusíku. V tomto případě dochází k aerobní hydrogenaci aromatického kruhu a k vytvoření Meisenheimerových a dihydrid-Meisenheimerových komplexů, následně pak k uvolnění dusíku (Snellinx a kol., 2002). Haddour a Ramos (1996) ukázali, že tento komplex může být *in vitro* transformován na 2,4-DNT. Na druhou stranu Vorbeck (1994) při práci se stejným klonem tento komplex neidentifikoval, ale již dříve popsal jeho vznik při použití *Rhodococcus erythropolis HL PM-1* a *Mycobacterium HI4-NT-1* (Vorbeck a kol., 1994).

Zaripov (2002) popsal u kvasinek rodu *Saccharomyces* metabolismus TNT, kde klíčový počáteční metabolit byl HADNT, ADNT a hydrid-Meisenheimerův komplex byly v minoritním zastoupení. Na druhou stranu u rodu *Candida* byl při degradaci TNT pozorován přenos hydridového iontu na aromatický kruh za vzniku hydrid-Meisenheimerova komplexu jako majoritního produktu (Vorbeck a kol., 1998).

Oxidační reakce, které byly doposud objasněny, následují až po prvotní redukci, kdy je vytvořena na kruhu druhá aminoskupina.

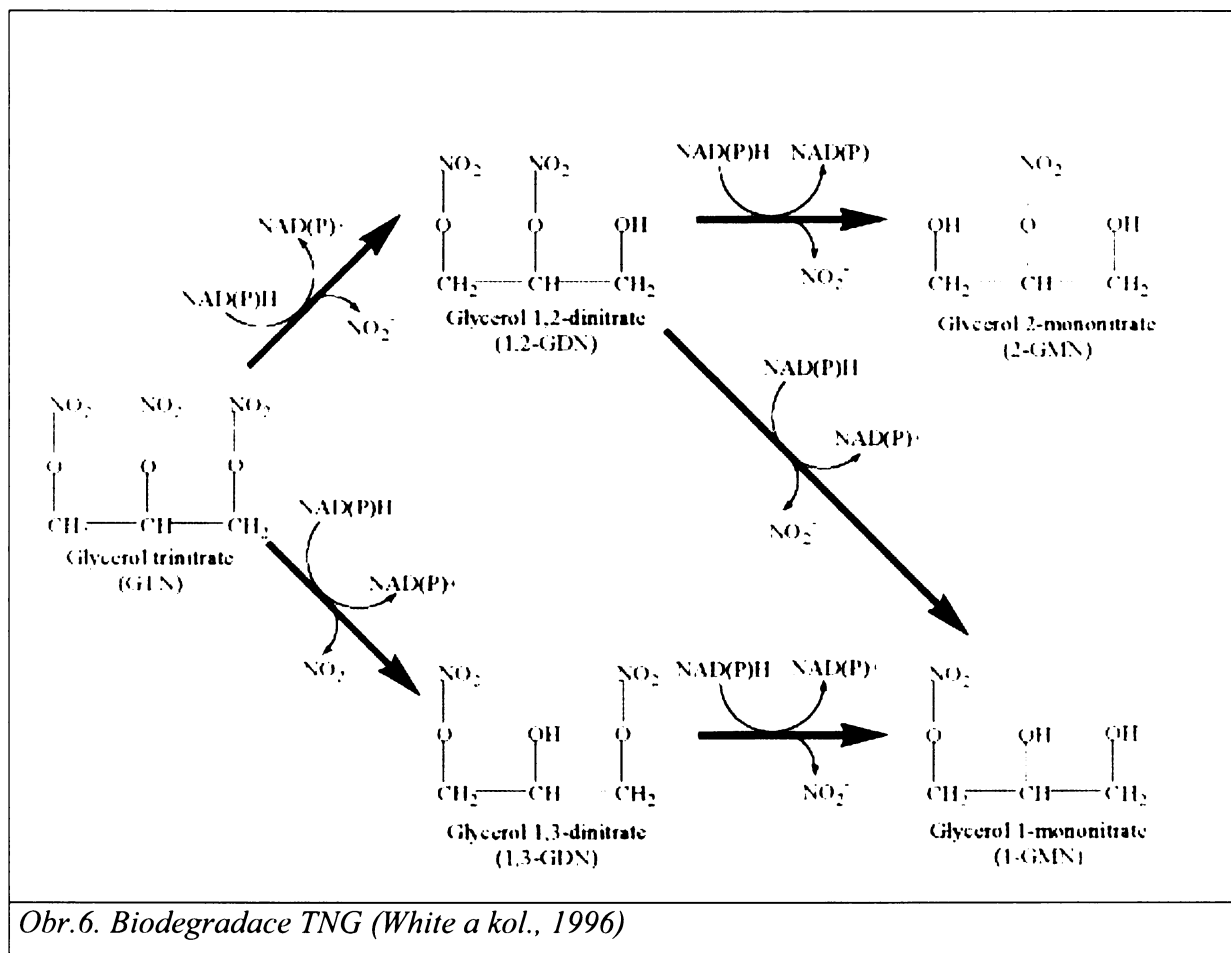
Redukce nitrosubstituentů anaerobními mikroorganismy byla popsána pro mnoho různých nitroaromatických sloučenin. Reakční rychlost klesá s počtem nitroskupin přeměněných na aminoskupiny (Preuss a kol., 1993). Kompletní přeměna TNT na TAT

vyžaduje striktně anaerobní podmínky. Prvně tuto postupnou degradaci TNT na TAT popsal McCormick, když použil bakteriální kmen *Veillonella alkalescens*. Dalším velmi vhodným subjektem k objasnění degradace TNT se ukázalo *Clostridium*, které je schopno velmi rychle degradovat TNT na TAT a fenolické látky (hydroxylaminodinitrotolueny) (Funk a kol., 1993; Ederer, 1997).

Na místech kontaminovaných 2,4-DNT našel Spain (1995) bakteriální kmeny, které využívaly tuto látku jako růstový substrát. Degradční cesta začínala dioxygenací vedoucí k 4-metyl-5-nitrokatecholu, který dále podlehl monooxygenaci, jejíž hlavním produktem byl 2-hydroxy-5-metylochion, který byl enzymaticky redukován na 2,4,5-trihydroxytoluen. Tento bakteriální kmen nebyl ovšem schopen degradace směsi izomerů DNT a po přidání 2,6-DNT došlo k inhibici degradace 2,4-DNT. V roce 1999 izoloval Nishino z kontaminované půdy jiný bakteriální kmen, který bez problémů degradoval směs obou izomerů, a využil ho pro čištění kontaminované vody v bioreaktoru (Nishino a kol., 1999)

Schopnost degradovat nitroestery byla testována u řady aerobních i anaerobních bakterií. Jedním z kmenů, u kterého byla tato schopnost prokázána, byl *Pseudomonas RI-NG1* izolovaný z říčního sedimentu, v laboratorních podmínkách nitroglycerin zcela odbourával za postupného vzniku obou izomerů dinitroglycerinu. Hlavním metabolitem byl 1,3-DNT, který převýšil svým množstvím 1,2-DNT téměř pětinašobně.

Po odbourání TNG, kdy dinitroglyceriny dosahovaly svých maxim, se začaly objevovat 1-mononitroglycerin a 2-mononitroglycerin, jejichž koncentrace vzrůstala na úkor poklesu koncentrace 1,2- a 1,3- MNG. 1-MNG vznikal přibližně šestkrát rychleji než 2-mononitroglycerin, což je způsobeno tím, že 1,3-DNG se může rozkládat pouze na 1-mononitroglycerin, zatímco 1,2-DNG může produkovat buď 1-mononitroglycerin nebo 2-mononitroglycerin podle toho, zda dojde k ataku na druhém nebo prvním uhlíku. Ukázalo se, že většina 1,2-DNG je odbourávána na 2-MNG, což indikuje přednostní atak na prvním uhlíku v 1,2-DNG. Projevuje se tu rozdílná selektivita ve srovnání s TNG, která je patrně důsledkem působení různých enzymů nebo důsledkem různých způsobů vazby substrátu na enzym (White a kol., 1996). Schopnost bakterií využívat TNG jako zdroj uhlíku je velmi dobře známa (Binks a kol., 1996; Blehert a kol., 1999; Meng a kol., 1995; Snape a kol., 1997). Ačkoliv mnohé z těchto bakteriálních kmenů jsou schopny odtržení jedné nebo dvou nitroskupin za vzniku DNG a následně MNG (Obr.6.), pouze u rodu *Rhodococcus* byla popsána schopnost degradovat MNG a dosáhnout tak kompletní mineralizace (Marshall a White, 2000). Úplná mineralizace byla již dříve popsána při použití smíšených bakteriálních kultur (Accashiam a kol., 1998; Wendta kol., 1978) a hub (Zhang a kol., 1997).



Obr.6. Biodegradace TNG (White a kol., 1996)

Rozpustnost RDX (42,3 mg.dm⁻³) a HMX (5 mg.dm⁻³) ve vodě je mnohem nižší než nitroaromatických, obě látky jsou také přístupnější fotolytické degradaci. (Binks a kol., 1995) McCormick a kol., 1981 uvádí netečnost k aerobním bakteriím s výjimkou populace získané z kontaminované půdy, která byla schopna využívat RDX jako zdroj dusíku. Transformace HMX těmito organismy nebyla potvrzena. Zhao izoloval ze sphaškových kalů bakterii *Klebsiella pneumonia*, která byla schopna degradovat RDX na formaldehyd a metanol (Zhao a kol., 2004).

1.4.2 Houby

V roce 1997 publikoval Scheibner a kol. (1997) rozsáhlou studii o degradaci TNT houbovými kulturami, kdy sledoval degradační schopnosti 91 kmenů různých ekologických i

taxonomických skupin. U všech kmenů byla pozorována schopnost redukční přeměny TNT na ADNT. Další mineralizace byly schopny jen dřevokazné houby a houby žijící v odpadech, které mají aktivní lignolytický aparát. *Basidiomycetes* jsou jediné organismy schopné kompletně degradovat lignin, jednu z nejstabilnějších aromatických biolátek na světě. Tyto houby jsou schopny degradovat také 2,4-DNT, TNT a polychlorované fenoly (Teramoto a kol., 2004a). Při následné degradaci aminoderivátů byla prokázána účast tzv. manganové peroxidasy, patřící k enzymům lignolytického aparátu, Michels a Gottschlak sledovali degradaci TNT houbou bílé hniloby *Phanerochaete chrysosporium* s aktivním lignolytickým aparátem a popsali hromadění hydroxylaminoderivátů, zejména v počátcích degradace. Tyto deriváty inhibovaly aktivitu ligninové peroxidasy, která se také účastní mineralizace TNT (Michels a Gottschlak, 1995; Rieble a kol., 1994). Metabolismus 2,4 DNT byl studován zejména na pupečníku obecném (*Hydrocotyle vulgaris*). Degradace začíná redukcí nitroskupiny na aminoskupinu a pokračuje sérií reakcí za působení peroxidasy, chinonreduktasy a dioxygenasy. Byla popsána i druhá cesta degradace přes hydroxylaci aromatického kruhu, která byla katalyzována cytochromem P450. Houby nejsou schopny oxidativně degradovat sloučeniny s tak vysokým ionizačním potenciálem jako jsou nitrosloučeniny a touto reakcí zřejmě vytvářejí struktury vhodné pro další oxidaci (Teramoto a kol., 2004b).

Ke studiu metabolismu nitroglycerinu u hub byly použity např. *Phanerochaete chrysosporium* a *Geotrichum candidum*. U obou docházelo k tvorbě dinitroglycerinu a mononitroglycerinu. V případě *P.chrysosporium* byl nitroglycerin přednostně odbourán (až z 80 %) na 1,2-DNG a dále 2-MNG. Produktem metabolismu *G.candidum* byla směs 1-MNG a 2-MNG. Konverze v obou případech probíhala nezávisle na přidávku zdroje organického dusíku a uhlíku. U *P. chrysosporium* bylo zjištěno, že přídavek zdroje organického uhlíku výrazně napomáhá přeměně nitroglycerinu na 1,2-DNG a 2-MNG (Christodoulatos a kol., 1997).

1.4.3 Vyšší rostliny

1.4.3.1 Příjem a distribuce

Nitrosloučeniny jsou v životním prostředí velmi persistentní, degradace obecně probíhá velmi pomalu, a to ať abioticky nebo pomocí živých organismů. Rozpustnost TNT ve vodě se pohybuje okolo $101,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ při 25°C (Ro a kol., 1996). Pro stanovení transportu nitroaromatických sloučenin ve spodní vodě jsou důležité kromě rozpustnosti a disperse také vazba na minerální a organické složky půdy. Hodnoty sorpčního koeficientu stanoveného v modelovém systému ukázaly jeho závislost na pH (pro sorpci na huminové kyseliny). Studie dále ukázala, že vysoká koncentrace TNT snižuje sorpční koeficienty a umožňuje tím rychlejší pronikání TNT půdou. Teoretický model Haderleina a Schwarzenbacha (1995) předpovídá pevnou vazbu TNT na jílové částice vytvořením elektronového komplexu akceptor-donor. Wessmahr a kol. (1998) připisují tomuto komplexu vytvoření silné vazby TNT na křemičitany (Lewis a kol., 2004). Příjem a degradace nitrosloučenin vyššími rostlinami závisí na vlastnostech půdy, (množství organického uhlíku), fyzikálně-chemických vlastnostech polutantu a vlastnostech rostlinného materiálu (Wenzel 1999). Dále pak na biodostupnosti kontaminantu a mikrobiální aktivitě v rhizosféře. Exudací některých sekundárních metabolitů mohou rostliny stimulovat růst specifických mikroorganismů (Alkorta, 2001). Sung ve svém matematickém modelu popisuje chování kontaminantů v rhizosféře, v kořenech a v nadzemních částech rostlin. K demonstraci svých výpočtů použil jako rostlinný materiál *Sorghum halepense* a jako polutanty TNT a chrysen (Sung, 2001).

Nitrosloučeniny stejně jako jiné organické polutanty mohou být transportovány do různých tkání, mohou podstoupit částečnou nebo kompletní degradaci a následně být volatilizovány, nebo mohou být transformovány na méně toxické sloučeniny a uskladněny ve vakuolách nebo zabudovány do buněčných struktur (Singh a Jain, 2003). Většina xenobiotik je přijímána společně s vodou a distribuce probíhá v xylému a ve floému. TNT bývá akumulován v kořenech, RDX a HMX mohou být transportovány i do nadzemních částí (Pennington a Brannon, 2002). Thompson (1999) použil k pokusům hybridní topoly pěstované hydroponicky. Dle HPLC detekce a detekce radioaktivně značeného RDX bylo 60 % RDX akumulováno v listech.

Bhadra a kol. (2001) studoval degradaci RDX ($8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a HMX ($5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) dvěma systémy - vodní rostlinou stolítek vodní (*Myriophyllum aquaticum*) a „hairy root“ kulturou barvínku růžového (*Catharanthus roseus*). Stolítek HMX neakumuloval ani

netransformoval, u barvíčku byla pozorována jen minimální akumulace. RDX byl akumulován v obou rostlinách. Sens a kol., (1998) sledoval distribuci ^{14}C -TNT a jeho derivátů u fazole (*Phaseolus vulgaris*). V kořenech bylo akumulováno 87 % radioaktivně značeného TNT, ale pouze 9 % ve vodě rozpustných konjugátů bylo transportováno do stonku a 4 % do listů. U vodních rostlin může docházet k příjmu těchto látek všemi částmi rostliny, které jsou v kontaktu s kontaminovanou vodou.

1.4.3.2 Transformace

Protože TNT neobsahuje funkční skupinu schopnou konjugace, iniciačním krokem při jeho metabolismu musí být transformace této molekuly. Ta může probíhat dvěma směry, buďto dochází k redukci jedné či více nitroskupin, čímž vznikají hydroxylamino nebo aminoskupiny a nebo je oxidována methylová skupina či přímo aromatický kruh. Tyto reakce stejně jako následná konjugace jsou vždy enzymově katalyzovány. Posledním krokem je uskladnění produktů transformace ve vakuole nebo jejich inkorporace do biopolymérů. Vodní rostliny jsou schopny vzniklé konjugáty vylučovat do okolního vodního prostředí.

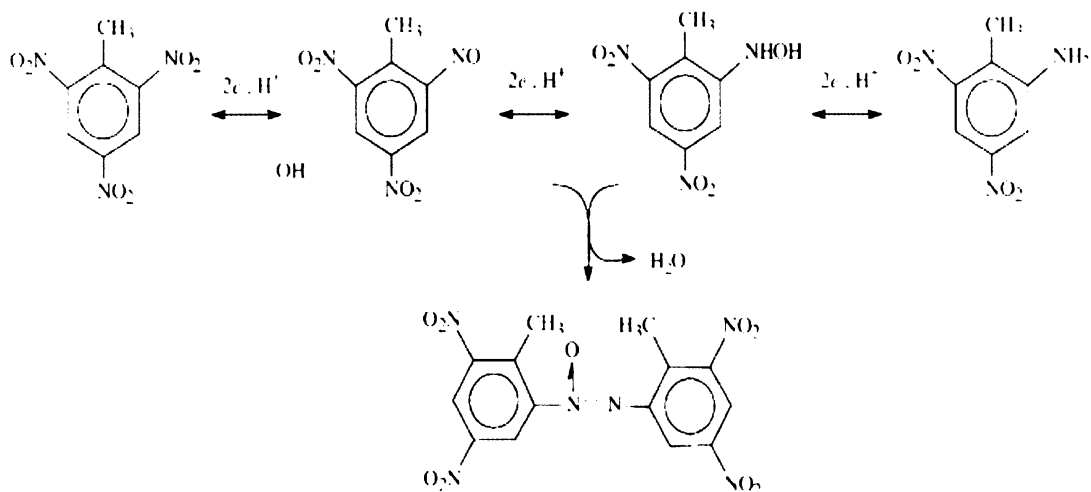
Intenzivní výzkum příjmu a metabolismu TNT a jiných nitrosloučenin rostlinami probíhá již od počátku osmdesátých let. Jako rostlinný materiál jsou používány jak terestriální tak mokřadní a vodní rostlinné druhy. Z důvodu stanovení účinku výlučně rostlinného metabolismu bez podpory mikrobiálního společenství jsou mnohými autory využívány metody kultivace *in vitro*, tkáňové či buněčné kultury (Burken a kol., 2000; Harvey a kol., 1990; Vaněk a kol., 2000, Nepovím a kol., 2000; Vila a kol., 2005)

1.4.3.2.1 Redukce

Prvními, kdo popsali degradační produkty vzniklé redukcí TNT v rostlinách, byli Palazzo a Legett v roce 1986. Ke svým pokusům použili hydroponicky kultivované rostliny šáchoru (*Cyperus esculentus*). Jako hlavní degradační produkt identifikovali 4-ADNT, který se nacházel zejména v kořenech, ve velmi malém množství identifikovali také 4-HADNT. Tyto produkty však vznikají též při mikrobiální degradaci TNT, a protože studie nebyla prováděna za sterilních podmínek, nebylo možné s jistotou potvrdit, že nalezené látky vznikly transformací v rostlinném organismu. V roce 1997 Hughes porovnával schopnost příjmu a transformaci TNT paralelně ve třech systémech – „hairy roots“ barvíčku (*Catharanthus*

roseus), sterilně kultivovaných rostlinkách stolítku (*Myriophyllum*) a jeho variantě ve volné přírodě. TNT bylo kompletně transformováno ve všech třech systémech, mineralizace nebyla pozorována (Hughes, 1997). Tyto práce potvrdily schopnost rostlin metabolizovat nitroaromatické sloučeniny, ale neposkytly žádné informace o produktech. Postupně byly popsány produkty vyskytující se v mediu a později i produkty extrahovatelné z rostlinného materiálu. Nejběžnější transformační reakcí nitrosloúčenin u rostlin je aerobní redukce (Burken a kol., 2000). Stejně jako u mikrobiální redukce byl popsán výskyt aminonitrotoluenů, hydroxyaminonitrotoluenů, diamininitrotoluenů (Harvey a kol., 1990; Scheidemann a kol., 1998; Schneider a kol., 1996; Bhadra a kol., 1999, Sun a kol., 2000; Best a kol., 1997; Rivera a kol., 1998; Wayment a kol., 1999; Larson a kol., 1999). Jejich koncentrace byla ovšem mnohem nižší, z čehož lze usuzovat na výskyt velkého množství produktů pevně vázaných v rostlinných polymerech. Většina autorů zmiňuje přítomnost aminodinitrotoluenů alespoň v malé koncentraci, naproti tomu velmi zřídka byly detekovány hydroxylaminoderiváty, zřejmě díky jejich velmi rychlému rozkladu v aerobním prostředí (Wang a kol., 2000). Stejně tak diaminonitrotolueny byly detekovány jen málokdy a pouze ve velmi nízké koncentraci (Rivera a kol., 1998). Např. Thompson detekoval diaminonitrotolueny, 0,4 % z původního množství TNT, při degradaci hybridními topoly (Thompson, 1997). Nikdy však nebyla prokázána přítomnost 2,4,6-triaminotoluenu. Tento konečný produkt by mohl vzniknout pouze za velmi redukčních podmínek ($E_h < -200$ mV), které nejsou v rostlině možné. Bhadra a kol., (1999) se zabýval distribucí ^{14}C v „hairy roots“ kultuře stolítku v počáteční fázi metabolismu radioaktivně značeného TNT. Během 75 h bylo v extrahovatelné frakci (obsahující TNT a aminoprodukty) méně než 5 % ^{14}C .

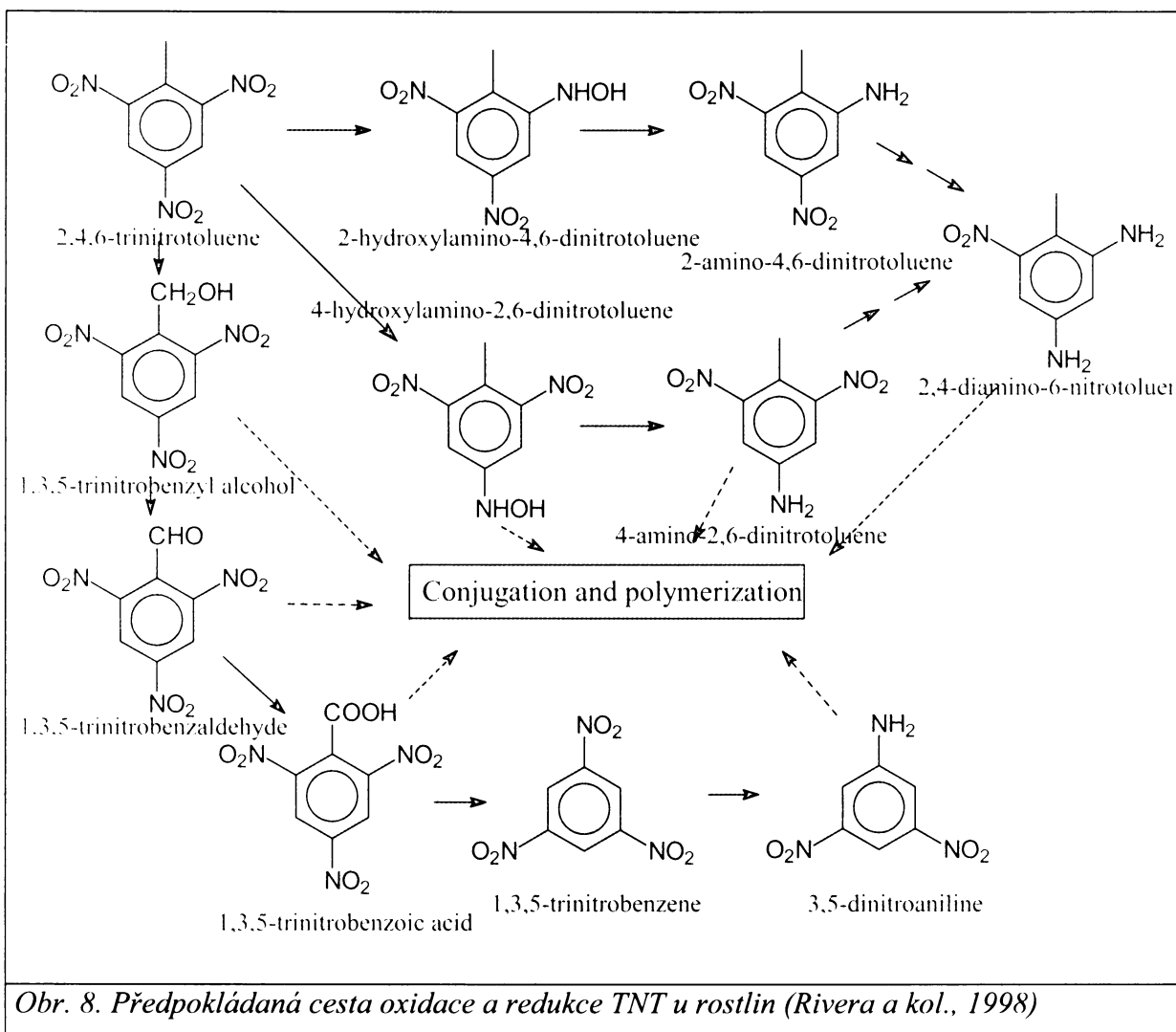
V posledních letech byla studována absorpce TNT a RDX mnoha terestriálními rostlinami (Palazzo a Leggett, 1986; Fellows a kol., 1992). Palazzo popsal rychlou redukci TNT rostlinami šáchoru (*Cyperus esculentus*), kdy pozoroval redukční produkty (4-ADNT) a (2-ADNT) v kořenech, listech, rhizomech i hlízách. Rostliny ochotně adsorbovaly TNT v koncentraci do 25 mg.dm⁻³. Produkce těkavých látek nebo mineralizace byla nepatrná. Většina ^{14}C -TNT se nacházela v kořenech - 22krát více než ve stoncích. Další pokusy s radioaktivně značeným TNT prokázaly rychlý úbytek TNT z media jak v případě stolítku (*Myriophyllum*), tak v kořenové kultuře barvínku (*Catharanthus roseus*) (Spain, 2000). Přítomnost azoxytetranitrotoluenů v mediu popsal např. Bhadra (1999) při použití rostlin stolítku inkubovaných s TNT (Obr. 7.).



Obr. 7. Redukce nitroskupiny TNT na aminoskupinu a kondenzace redukováných intermediátů za vzniku azoxytetranitrotoluenu (Lewis, 2004)

1.4.3.2.2 Oxidace

K degradaci TNT dochází i abioticky a to oxidací methylové skupiny TNT katalyzovanou světlem (Haderlein a Schwarzenbach, 1995; Mabey a kol., 1983). Oxidační metabolismus TNT v rostlinách je zatím málo prozkoumán, důvodem může být vysoká polarita produktů, což ztěžuje analýzu. O jeho mechanismu lze spekulovat pouze ze znalosti podobného procesu u herbicidů, kde je oxidace prvním krokem vedoucím k jejich aktivaci nebo deaktivaci. Lze tedy předpokládat účast cytochromů P-450. Tyto enzymy jsou lokalizovány v hladkém endoplasmatickém retikulu rostlinných buněk a vyžadují kyslík jako druhý substrát a NADPH jako kofaktor (Hannink, 2002). První důkazy o oxidativním metabolismu TNT u rostlin podal Bhadra v roce 1999. K pokusům použil stolítek vodní a inkuboval ho s TNT. Kromě redukčních produktů identifikoval šest dalších sloučeniny (2-amino-4,6-dinitrobenzoová kyselina, 2,4-dinitro-6-hydroxy-benzyl alkohol, 2-N-acetoxiamino-4,6-dinitrobenzaldehyd, 2,4-dinitro-6-hydroxytoluen a dva dvoujaderné metabolity), které vznikly oxidací methylové skupiny nebo hydroxylací přímo aromatického kruhu. Nebylo prokázáno, že by oxidaci podléhaly redukční metabolity (Nepovím a kol., 2004; Vaněk a kol., 2003).



Obr. 8. Předpokládaná cesta oxidace a redukce TNT u rostlin (Rivera a kol., 1998)

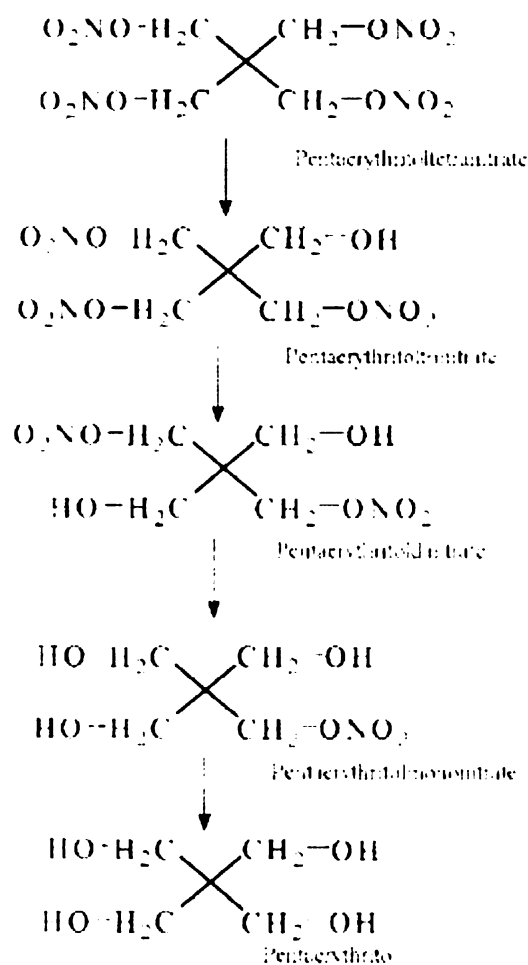
1.4.3.2.3 Konjugace

Potvrzením vzniku konjugovaných produktů je zvýšení molekulové hmotnosti u látek obsahujících značený uhlík ¹⁴C. Dle hmotnostního spektra se jedná o cukerné látky s šesti uhlíky. Nejpravděpodobněji se na konjugaci s cukrem podílí aminoskupina u 2-ADNT a 4-ADNT, ale jak ukázaly další studie dochází částečně ke konjugaci již u hydroxylaminoderivátů. Pokud byly „hairy roots“ barvínku růžového vystaveny působení přímo 2-ADNT a 4-ADNT, vznikaly pouze dva ze čtyř konjugátů prokázaných při degradaci TNT. Tvorba konjugátů je velmi důležitým krokem v mechanismu ukládání metabolitů TNT do buněčné stěny. O tom, že jsou tyto látky dále pevně navázány do buněčných struktur svědčí významné snížení extrahovatelných metabolitů již po několika hodinách degradace. Sense a kol., (1998) použil značeného TNT k určení distribuce ¹⁴C v buněčných frakcích. Více než 50 % bylo nalezeno ve frakcích spojených s buněčnou stěnou. Nejvíce těchto

metabolitů bylo vázáno v ligninové frakci, dále pak v hemicelulozové frakci a malé procento v pektinové. Určení chemické struktury těchto látek je extrémně těžké. Obecně je tento krok považován za dostatečnou detoxikaci látek, nicméně toxicita reziduí vzniklých degradací aromatických nitrosloúčenin nebyla zatím studována, nelze vyloučit nebezpečí vstupu těchto látek do potravního řetězce. Celková hmotnostní bilance všech identifikovaných metabolitů nebyla stanovena pro žádný rostlinný druh. Podle předběžných odhadů 94 % TNT je přeměněno, ale chemické charakteristiky nejsou známy u 43 % produktů. Tyto poměry se samozřejmě u různých rostlinných druhů mohou měnit.

1.4.3.2.4 Metabolismus alifatických nitrosloúčenin

Na rozdíl od RDX a HMX, u kterých nebyla transformace rostlinným metabolismem popsána, schopnost rostlin degradovat TNG na DNG a následně MNG demonstroval u cukrovky Goel a kol. již v roce 1997. Stejně degradační produkty popsal Vaněk a kol. (2003) u suspenzní kultury rebarbory (*Rheum palmatum*). U stejné kultury popsal také degradaci PETN vedoucí k pentaerythriolu, který může být využit jako zdroj uhlíku. V mediu suspenzní kultury identifikoval všechny čtyři možné produkty enzymaticky katalyzované hydrolýzy nitroesterů (*Obr. 9.*).



Obr.9. Degradace PETN (Vaněk a kol., 2003)

1.4.4 Enzymy účastníci se degradace nitroláték

„Phytoremediation related proteins (PRP)“ jsou rostlinné proteiny, které se podílejí na remediaci polutantů jejich vazbou, transformací nebo transportem. Nové poznatky o genomu *Arabidopsis thaliana* umožnily charakterizovat 700 potenciálních PRP proteinů, asi 450 z nich jsou enzymy katalyzující chemické reakce, přibližně 250 je transportních proteinů a dále jsou to například bílkoviny vyvazující kovové ionty. Nejdůležitější roli hrají enzymy pěti tříd, které jsou kódovány velkými rodinami genů (26-200genů) (Cobbet a Meagher, 2002).

1.4.4.1 Nitroreduktasy

Prvním krokem fyziologické nebo i abiotické transformace mnoha různých nitroaromatických sloučenin je redukce nitroskupiny. Nitroredukce je zahájena sérií jedno- nebo dvouelektronových přenosů. Redukce TNT začíná na nitroskupině v pozici C₂ nebo C₄. Kompletní redukce nitroskupiny na aminoskupinu požaduje přenos šesti elektronů, obvykle sérií postupných dvouelektronových přenosů. Po přenosu prvního páru elektronů vznikne nitroso-intermediát (R-NO), po dalším dvouelektronovém přenosu hydroxylamino-derivát (R-NHOH). Přenos posledního páru elektronů vede k plně redukované aminoskupině (R-NH₂).

Enzymy, které katalyzují redukci aromatické nitroskupiny, nazývané nitroreduktasy, jsou rozdělovány do dvou skupin majících odlišné vlastnosti (Peterson a kol., 1979). Typ I nitroreduktas katalyzuje redukci nitroskupiny (NO₂) sérií dvouelektronových přenosů, produkujících nitroso- (R-NO), hydroxylamino- (R-NHOH) a amino- (R-NH₂) derivátů (Morikawa a Erkin, 2003). Mezi tyto enzymy patří např. nitroreduktasy u enterobakterií (Bryant a DeLuca, 1990), NADPH-chinonoxidoreduktasa (EC 1.6.5.5) u savců a xanthindehydrogenasa (EC 1.1.1.204) u potkanů (Bryant a McElroy 1991). Typ II nitroreduktas katalyzuje redukci nitroskupiny sérií jednoelektronových přenosů zahájenou vznikem vysoce reaktivního aniontu. Pokud je produkován za aerobních podmínek, je tento radikál okamžitě reoxidován molekulárním kyslíkem na superoxidový radikál a prvotní nitroaromatickou sloučeninu (Peterson a kol., 1979, Bryant a McElroy 1991). Tato nekompletní reakce je nazývána „marný“ cyklus, protože redukční ekvivalenty, obvykle redukované formy nikotinamidadenin dinukleotidu (NADH) nebo nikotinamid dinukleotidfosfátu (NADPH), jsou oxidovány, což má za následek nulovou redukci aromatické nitroskupiny (Müller 1983). A tak tyto enzymy mohou redukovat nitroaromatické sloučeniny pouze za anaerobních podmínek (Peterson a kol., 1979). Nitroreduktasy typu II zahrnují cytochrom P-450-reduktasu (EC 1.6.2.4), cytochrom c reduktasu (EC 1.6.2.4), aldehydoxidasu (EC 1.6.2.4), glutathionreduktasu (EC 1.6.2.4), xanthindehydrogenasu (EC 1.1.1.204), sukcinátdehydrogenasu (EC 1.3.99.1) a chinonreduktasu (EC 1.6.99.2) (Bryant a McElroy 1991).

Purifikace a charakterizace bakteriálních nitroreduktas odhalila, že mnoho těchto enzymů má podobné funkce. Většina z nich je indukovatelná a schopná redukovat množství různých nitroaromatických sloučenin na nitroso-, hydroxylamino- a amino- metabolity využívající buď NADH, nebo NADPH jako zdroj redukčních ekvivalentů. Přitom většina nitroredukčních enzymů je schopna využívat oba dinukleotidové elektronové donory, z nichž

určité specificky preferují buď NADPH nebo NADH. Mnoho známých nitroreduktas vyžaduje pro redukci flavinmononukleotid nebo flavinadenindinukleotid. Zdá se, že nitroreduktasy mají široké rozmezí substrátové specifity pro nitroaromatické sloučeniny s výjimkou alifatických nitrosloučenin (Kinouchi a Ohnishi, 1983, Bryant a DeLuca 1990).

Mnoho bakteriálních kmenů, které byly izolovány z půdy kontaminované výbušninami TNG a PETN, je schopno tyto estery kyseliny dusičné degradovat. Všechny tyto kmeny obsahují NADH-dependentní oxidoreduktasy, které katalyzují štěpení nitrát esterové vazby za vzniku alkoholu a nitritu. Tyto enzymy všechny obsahují flavin mononukleotid jako prostetickou skupinu a mají podobnou aminokyselinovou sekvenci s kvasnicovými enzymy z rodiny „Old Yellow Enzyme“ (OYE, EC 1.6.99.1). První z této rodiny byl identifikován Theorellem již v roce 1935. Navzdory tomu, jeho fyziologická funkce zůstává neobjasněna. Poprvé byl izolován z pivovarských kvasnic jako heterogenní směs několika isoform. Jedná se o dimer (49 kDa), kdy každá podjednotka obsahuje jednu nekovalentní vazbu s FMN, jako přirozený reduktant slouží NADPH (Kohli, 1998).

PETN reduktasa, která byla izolovaná z *Enterobacter cloacae* je zodpovědná za schopnost této bakterie využívat nitrosloučeniny jako zdroj dusíku, jedná se o NADPH-dependentní flavoenzym, který reaguje s nitroaromatickou sloučeninou (Binks a kol., 1996). Ve svém článku Khan poukazuje na příbuznost tohoto enzymu s rodinou OYE, ale i na rozdíly v jejich reaktivitě. Izolované homology k PETN reduktase z *Pseudomonas* a *Agrobacterium* také reagovali s nitroaromatickými sloučeninami, a to buď adicí hydridu na aromatické jádro nebo redukcí nitroskupin. Některé steroidy mohou být substráty a jiné inhibitory PETN-reduktázy (Khan a kol., 2000).

1.4.4.2 Oxygenasy

Po vazbě kyslíku na hydrofobní sloučeninu se zvýší její rozpustnost a chemická reaktivita, čehož je dosaženo pomocí dioxygenas, monooxygenas a peroxidas. Cytochrom P-450 představuje třídu enzymů přítomnou ve většině organismů, která katalyzuje rozličné typy oxygenačních reakcí eobiotických a xenobiotických sloučenin.

Cytochromy P-450 jsou membránově vázané proteiny, obvykle fungující jako monooxygenasy. Tyto enzymy používají elektrony z redukovaného NADPH, aby aktivovaly molekulární kyslík, inkorporovaly jeden z atomů kyslíku do organické sloučeniny a redukovaly druhý atom na vodu. Elektrony z NADPH jsou přenášeny na cytochromy P-450

cestou flavoproteinů nazývaných cytochrom P-450 reduktasy. Rostlinné cytochromy P-450 a asociované reduktasy jsou obvykle vázány v cytoplazmě na povrchu endoplasmatického retikula.

Hlavní funkcí cytochromů P-450 ve vyšších rostlinách je biosyntéza sterolů, lipidů, hormonů a specifických metabolitů jako isoprenoidů, alkaloidů nebo aminokyselinových derivátů. Pravděpodobně druhotnou funkcí cytochromů P-450 je katalyzace některých reakcí v metabolismu xenobiotik, jako jsou herbicidy, insekticidy nebo další polutanty (Schuller 1996, Khatishvili a kol., 1997, Schalk a kol., 1997, Stiborova a kol., 2000). Některé tyto enzymy jsou přítomny ve většině rostlinných tkání, naproti tomu aktivita jiných enzymů je omezena jen na specifické tkáně a orgány. Některé cytochromy P-450 jsou aktivní vždy (konstitutivní forma), aktivita druhých se stává významná teprve po chemickém působení (jsou indukovatelné). Existence těchto mnohočetných forem enzymu je řízena množstvím induktorů, které jsou klíčové v metabolismu xenobiotických sloučenin. Souhra specifických forem P-450 a induktorů podmiňuje, která xenobiotika budou metabolizovány v dané tkáni a jakou rychlostí (Durst a kol., 1997, Robineau a kol., 1998).

1.4.4.3 Peroxidas

Peroxidas jsou hem obsahující enzymy, které primárně redukují peroxid vodíku na vodu, Intracelulární a extracelulární peroxidas se nacházejí vázány na obou stranách membrány. Jsou známy formy jak konstitutivní, tak indukovatelné.

Rostlinné peroxidas (EC 2.5.1.18) jsou hojně se vyskytující multifunkční enzymy účastníci se detoxikace H_2O_2 . Jsou lokalizovány převážně v buněčné stěně a ve vakuolách a jejich úkolem je nespecifická oxidativní polymerizace fenolových jednotek v buněčné stěně vedoucí k tvorbě ligninu (Lagrimini, 1991; Fry, 1986), jsou také odpovědné za patogenní rezistenci (Salzer a Hager 1993) a metabolismus hormonů (Gunse a Elstner 1992). Zvýšenou produkci peroxidas jako reakci na stres ze sucha a při následném usychání rostlin popsal Gramess a kol. (1999), stejně tak byla pozorována zvýšená produkce peroxidas kořenovou kulturou křenu (*Armoracia rusticana*) při chemickém stresu (Soudek a kol., 1998; Hirata a kol., 2000; Nepovím a kol., 2004). Struktura peroxidas (kruh periferně umístěných fenolových residuí) nabízí možnost vazby aromatických substrátů, a tím účast na degradaci aromatických nitrosloučenin.

1.4.4.4 *Glutathion-S-transferasy*

Glutathion (Glu-Cys-Gly) a homoglutathion (Glu-Cys-Ala) jsou tripeptické sloučeniny se stěžejní funkcí pro zachování živých organismů. Glutathion-S-transferasa (EC 2.5.1.18) katalyzuje přenos těchto tripeptidů na určité organické kontaminanty (Chasseaud 1974). V rostlinách byly poprvé identifikovány zhruba před 30-ti lety při detoxikaci herbicidů, kde katalyzují jejich konjugaci s glutathionem (Lamourex a kol.,1991; Andrews a kol.,1997). Glutathion-S-transferasy (GST) jsou hojně nacházené ve všech rostlinných orgánech (Pflugmacher a Sandermann 1998, Schrenk a kol.,1998, Pflugmacher a kol., 2000). Zdá se, že glutathiontransferasy jsou hlavním obranným mechanismem vyšších rostlin proti xenobiotikům a vlastním toxickým organickým molekulám (Cummins a kol.,1997, Edwards a kol.,2000). GST jsou tvořeny ze dvou podjednotek, ty mohou být identické (homodimery) nebo odlišné (heterodimery). Každá z těchto podjednotek se skládá z vysoce specifické domény pro navázání glutathionu (G-místo) a variabilní domény pro vazbu hydrofobních sloučenin (H-místo). Rostlinné GST jsou překvapivě odlišné, ale mohou být sdruženy do čtyř různých tříd na základě podobnosti v sekvenci aminokyselin (Rossini a kol.,1996; Edwards a kol., 2000). Sjednocená GST nomenklatura stojí na rozřazení do těchto čtyř tříd: phi (typ I), zeta (typ II), tau (typ III) a theta (typ IV). Třídy theta a zeta byly objeveny také u živočichů a zdá se, že mají velmi specifické funkce. Třída zeta transferas působí v katabolismu aromatických aminokyselin, přičemž theta GST má peroxidasovou aktivitu a účastní se pravděpodobně detoxikace produktů oxidačního stresu. Zbylé třídy dvě třídy, phi a tau, se vyskytují pouze u rostlin. Jsou to nejvíce zastoupené třídy rostlinných GST a jsou zodpovědné za většinu konjugačních reakcí zahrnujících i reakce s xenobiotickými sloučeninami (Edwards a kol., 2000). Nepovím a kol.(2004) studoval vliv nitroaromatických sloučenin na aktivitu glutathion-S-transferázy v průběhu degradace nitrosloučenin. Zvýšení aktivity záviselo na délce působení a koncentraci testované látky. Již nízká koncentrace DANT a DNT (0,1mM) způsobila zvýšení aktivity GST v kořenech po 6 hodinách. Naproti tomu při expozici na TNT a ADNT byla pozorována zvýšená aktivita GST až po 27 hodinách.

1.4.4.5 Glykosyltransferasy

Vazba sacharidů na endogenní nebo exogenní organické sloučeniny je široce rozšířenou konjugační reakcí jak mezi rostlinami tak i živočichy. Konjugace se sacharidy, nejčastěji glukózou, zvyšuje rozpustnost ve vodě, zlepšuje chemickou stabilitu, redukuje chemickou reaktivitu a pozměňuje biologickou aktivitu organických molekul. O-, N-, S- nebo C-glykosyltransferasy (GT), užívající nukleotidem aktivovaný sacharid, jsou schopny připojit sacharidovou jednotku na atom kyslíku (O), dusíku (N), síry (S) a uhlíku (C), sloučeniny rostlině vlastní nebo xenobiotickou (Jones a Vogt, 2001).

UDP-glukosyltransferasa je enzym, který katalyzuje přenos glukózy z UDP-glukózy na jinou sloučeninu. Pro reakci je nezbytná aktivace glukózy uridindinukleotidtrifosfátem (UTP). Glykosylované metabolity jsou považovány za konečné produkty detoxikace organických sloučenin (Hatzios a Penner, 1982). Vzniklé konjugované produkty jsou méně toxické, více stabilní, rozpustné a polární a mají vyšší molekulovou hmotnost než původní sloučenina. Tato změna ve struktuře a identitě způsobí, že metabolity mají rozdílné chemické a fyzikální vlastnosti ve srovnání s původní molekulou, což dělá tyto produkty obtížně detekovatelné.

1.5 FYTOREMEDIACE

Poznání nebezpečí plynoucího z přítomnosti jak cizorodých organických sloučenin, tak i nepřírodných koncentrací anorganických látek (např. těžkých kovů) v životním prostředí, vedlo k vývoji technologických postupů, které by umožnily jeho ozdravení (dekontaminaci). Byla vyvinuta celá řada *in situ* a *ex situ* technologií, více či méně technicky i ekonomicky náročných, vedoucích k částečnému nebo úplnému odstranění problematického xenobiotika. Bohužel řada těchto technologií představuje hrubý zásah do krajiny, narušení ekosystémů a z toho plynoucí důsledky. Neustále se však vyvíjejí a testují nové technologie, které jsou na rozdíl od klasických remediačních metod jako je např. spalování či skládkování, k přírodě šetrnější, nenarušují vzhled krajiny a někdy dokonce přispívají k jeho zlepšení. Patří mezi ně i fytoremediační technologie.

Fytoremediace jsou nově se rozvíjející technologie využívající vyšších rostlin a příslušných rhizobiálních mikroorganismů k absorpci a/nebo přeměně toxických sloučenin

z půdy, sedimentů, spodní i povrchové vody a dokonce i z atmosféry. Tato metoda je v současnosti testována na mnoho typů polutantů jako jsou ropné produkty, chlorovaná rozpouštědla, pesticidy, výbušniny, těžké kovy, radionuklidy (Susarla 2002). Pro úspěšnou fytoremediaci je nutná biologická přístupnost kontaminantů z vody a půdy pro rostliny, která je dána zejména rozpustností látky, typem půdy a stářím kontaminace. Přibližně 80 % kontaminované podzemní vody se nachází v hloubce do 20m, což umožňuje efektivně využít pro její čištění této nové biotechnologie (Best 1997). Rostliny mohou podporovat remediační proces mnoha způsoby- modifikací fyzikálních a chemických vlastností půd, vypouštěním kořenových exudátů, zvýšením aerace půdy, zpomalení či zastavení pohybu polutantů (Susarla, 2002).

Důvodů pro rozvíjení této technologie je několik. Především lze dosáhnout snížení nákladů při dekontaminačních procesech. Fytoremediace předpokládá využití známých agrotechnických postupů běžně používaných při zemědělském hospodaření. Z toho vyplývá, že finanční vstupy jsou obecně nízké a náklady na průběh remediace minimální. Další výhodou fytoremediace je šetrný přístup k prostředí, neboť se vyhýbá odstranění půdy a použití těžké techniky. Z tohoto pohledu je fytoremediace příznivě přijímána veřejností (Boyajian a Carreira, 1997; Singh a kol., 2003). Na kontaminovaných místech nacházíme přirozené rostlinné druhy, které jsou přizpůsobené životu v tomto prostředí a proto můžeme předpokládat jejich úspěšné využití pro fytoremediační techniky. Bohužel mnohé tyto druhy jsou vázány na původní biotop a nelze je využít za jiných klimatických podmínek nebo se nehodí pro velkoplošnou kultivaci z agrotechnického hlediska. Proto se jeví jako výhodnější druhý způsob a to šlechtění zemědělských plodin. Efektivnost využití fytoremediační technologie a možnosti jejího dalšího zdokonalování byla diskutována mnoha autory např. (Cunningham a kol., 1995; Burken a kol., 2000; Williams a kol.,2002; Sung a kol.,2004; Vaněk a Schwitzguébel, 2003). V následujících řádcích jsou shrnuty výhody a nevýhody použití této metody.

Výhody fytoremediace:

- využívá sluneční energii
- levnější než tradiční metody in-situ , ex-situ
- jednoduchý monitoring rostlin
- získané drahé kovy lze opět použít
- nejméně destruktivní metoda remediace, protože využívá přírodních organismů
- zachovává přirozený stav prostředí

Nevýhody fytoremediace:

- remediace je omezena pouze na oblast, kterou pokrývají kořeny rostlin
- pomalý růst biomasy, zvláště některých druhů rostlin
- vysoké koncentrace kontaminantů rostliny inhibují
- nelze zabránit vyluhování kontaminantů do podzemní vody
- hrozí akumulace kontaminantů v potravním řetězci

Fytoremediační technologie dělíme podle mechanismu účinku (*Tab.3.*).

Tab.3. Přehled fytoremediačních technologií

Mechanismus	Cíl metody	Média	Kontaminanty
Fytoextrakce	Extrakce a zachycení	Půdy, kaly, sedimenty	Ag, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn ⁹⁰ Sr, ¹³⁷ Cs, ²³⁹ Pu, ²³⁸ , ²³⁴ U
Rhizofiltrace	Extrakce a zachycení	Podzemní a povrchová voda	Kovy, radionuklidy
Fytostabilizace	Imobilizace	Půdy, kaly, sedimenty	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn
Rhizodegradace	Destrukce	Půda, sedimenty, kaly, podzemní voda	Organické sloučeniny(TPH, PAH, PCB, pesticidy, chlorovaná rozpouštědla)
Fytodegradace	Destrukce	Půda, sedimenty, kaly, podzemní a povrchová voda	Organické sloučeniny, chlorovaná rozpouštědla, fenoly, herbicidy, výbušniny
Fytovolatilizace	Extrakce z média a následný výpar do ovzduší	Podzemní voda, sedimenty, kaly	Chlorovaná rozpouštědla, Se, Hg, As
Hydraulická regulace	Degradace nebo izolace	Podzemní a povrchová voda	Ve vodě rozpustné látky

1.5.1 Fytoextrakce

Schopnost rostlin přijímat a akumulovat anorganické kontaminanty (především kovy) je nejrozšířenější fytoremediační technologii (McCutcheon a Schnoor, 2003). Vybrané rostliny se využívají především k extrakci toxických kovů, včetně radioaktivních izotopů, ale i k odstranění některých organických látek. Nejběžněji jsou chemické látky přijímány a transportovány ve formě vodných roztoků. Rhizodermis a endodermis tvoří nejvýznamnější

barieru pro jejich příjem. Rostliny disponují různými mechanismy kontroly jejich příjmu. Např. změna pH může mít za následek vytvoření elektrochemického gradientu, který napomáhá transportu kationtů a aniontů. Tento mechanismus vyžaduje energii ve formě ATP. Mnoho kationtů vstupuje do buněk iontovými kanály. Další speciální mechanismus příjmu kovů je tvorba komplexů kov-chelát. Při nedostatku kovových iontů jsou cheláty exudovány do rhizosféry. Komplex kov-chelát je pak do rostliny transportován pomocí specifických transportních proteinů (Von Wiren a kol., 1996).

Některé druhy rostlin jsou vysoce tolerantní vůči přítomnosti toxických kovů v půdě a navíc jsou schopné akumulovat tyto kovy do vysoké koncentrace ve svých pletivech bez nepříznivého vlivu na jejich růst a prosperitu. Takové rostliny se nazývají hyperakumulátory. Termín hyperakumulátor poprvé použili Brooks a spol. v roce 1977 a to pro ty rostliny, které jsou schopné akumulovat těžké kovy v listech v koncentracích větších než 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. Podle Bakera a spol. (1994) jsou hyperakumulátory rostliny, které akumulují Ni a Zn v koncentracích převyšujících 2 % sušiny nadzemních částí rostliny (Tab.4.).

Tab. 4. Hyperakumulátory těžkých kovů

Hyperakumulátor	kov	reference
<i>Brassica juncea</i>	Pb, Cr(VI), Cd, Cu, Ni, Zn, ⁹⁰ Sr, B a Se	Clement a kol., 2003
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Ni, Zn a Cd	Levent a kol., 2003 Boominathan a Doran, 2003
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	Pb	Wenzel a Jockwer, 1999
<i>Sesbania drummondii</i>	Pb	Sahi a kol., 2002
<i>Alyssum bertolonii</i>	Ni	Anderson a kol., 1999
<i>Elsholtzia splendens</i>	Cu	Jing a kol., 2003
<i>Sedum alfredii</i>	Pb	Bing a kol., 2003

Při výběru rostlin pro fytoextrakci kovů je vhodné vzít v úvahu rovněž další požadavky, jako je schopnost akumulovat kovy při jejich nízké koncentraci v půdě, akumulovat více druhů kovů, odolávat jejich vysokým koncentracím v půdě a tvořit dostatečné množství biomasy. Za hyperakumulátor těžkých kovů je považována např. *Thlaspi caerulescens*, *Brassica oleracea*, *Apocynum cannabinum*, *Aeollanthus* (Baker, 1995, Kramer a kol., 1996). Pokud se podaří najít takovou rostlinu, která vyhovuje uvedeným požadavkům,

může být i finančně výhodné získávat akumulované kovy z rostlinného materiálu zpět. Mnoho studií se soustřeďuje na nalezení vhodných hyperakumulátorů těžkých kovů, řada dalších se zabývá hledáním rostlinných druhů se schopností akumulovat ve zvýšené míře radionuklidy.

Hakonson-Hayes a spol. (2002) se zabývali vlivem pitné vody s obsahem uranu na zeleninu v oblasti severního Nového Mexika. Pro testy použili *Lycopersicon esculentum*, *Cucurbita pepo*, *Lycyca scarriola* a *Raphanus sativus*. Množství uranu v zelenině klesalo v pořadí ředkev – salát – dýně – rajče. Při koncentraci 1200 $\mu\text{g (U).dm}^{-3}$ dýně přijala přes 2500 $\mu\text{g.(U).kg}^{-1}$ sušiny. Baumgertner a spol. (2000) ale při svých pokusech zjistil, že dýně uran neakumuluje.

Z množství publikovaných údajů je zřejmé, že velký počet rostlinných druhů rostoucí v nejrůznějších prostředích je schopen akumulovat velká množství radionuklidů z kontaminovaných půd a že schopnost akumulace radionuklidů je u různých druhů odlišná. Např. Nifontova a kol., (1989) uvádějí na základě průzkumu, že rostliny dvanácti lesních a pěti lučních rostlinných společenstev z blízkosti Bělojarské atomové elektrárny v regionu Uralu v Rusku akumulovaly mezi 530 a 1 500 Bq ^{137}Cs a mezi 300 a 1 100 Bq ^{90}Sr . Wallace a Romney (1972) zjistili, že velké množství rostlinných druhů v pouštní oblasti v blízkosti Nevadské testovací plochy akumuluje významná množství radionuklidů z půdy kontaminované povrchovými jadernými testy.

Podstatné množství radionuklidů jsou schopny akumulovat také dřeviny. Např. Pinder a kol., (1984) publikovali, že *Acer rubrum*, *Liquidambar stryaciflua* a *Liriodendron tulipifera* akumulují významná množství ^{244}Cm , ^{137}Cs , ^{238}Pu , ^{226}Ra a ^{90}Sr . Robison a Stone (1992) zjistili, že *Cocos nucifera* akumuluje podstatné množství ^{137}Cs z půdy kontaminované při testování jaderných zbraní na atolu Bikini. Také popsali, že přidání draslíku a fosforu do půdy snížilo množství ^{137}Cs , které bylo stromy přijato. Entry a kol., (1993) porovnáním akumulčních schopností několika druhů borovic zjistili, že semenáčky *Pinus radiata* akumulují více ^{137}Cs a ^{90}Sr než *Pinus ponderosa*. Ve své další práci uvádějí, že semenáčky *Eucalyptus tereticornis* odstranily po jednom měsíci expozice 31.0 % ^{137}Cs a 11.3 % ^{90}Sr z rašeliny, ve které rostly.

Akumulace ^{137}Cs a ^{90}Sr v travách a ostatních bylinách byla také široce dokumentována. Např. Salt a kol., (1992) popsali experiment, ve kterém *Lolium perenne*, *Festuca rubra*, *Trifolium repens* a *Cerastium fontanum* na znovu oseté pastvině ve Skotsku akumuluje od 28 do 1040 Bq ^{137}Cs na gram rostlinné tkáně. Cougherty a kol., (1989) zjistili, že rostlinné společenstvo tvořeno převážně druhy *Festuca/* a *Agrostis* je schopno akumulovat 4 – 19 % ^{137}Cs z černobylského radioaktivního spadu. Tíž autoři uvádějí, že z 10

analyzovaných druhů trav, rostoucích na náhorní plošině ve Velké Británii, byla nejvyšší akumulace ^{137}Cs v *Carex* spp. (Coughtrey a kol., 1989).

Radionuklidy jsou akumulovány i fytoplanktonem a vodními rostlinami. Penntila a kol., (1993) popsal, že tyto rostliny jsou konzumovány vodními a suchozemskými živočichy a ^{137}Cs a ^{90}Sr mohou být touto cestou bioakumulovány a eventuálně začleněny do potravního řetězce člověka. Schopnost akumulovat radionuklidy je mezi vodními rostlinami také vysoce variabilní. Například Whicker a kol., (1990) popsal, že vodní makrofyt *Hydrocotyle* spp. akumuluje více ^{137}Cs a ^{90}Sr než 15 dalších vodních rostlin.

1.5.2 Rhizofiltrace

Rhizofiltrace je metoda, která využívá kořenů rostlin k absorpci, koncentraci a precipitaci xenobiotik z proudící vody. Metoda je vhodná především pro odstranění nízkých koncentrací kovů, kdy nelze efektivně využít jinou dekontaminační metodu. Absorpce těžkých kovů a jejich translokace do nadzemních částí rostlin byla pozorována u hydroponicky pěstovaných rostlin (Salt a kol., 1998). Cheng a kol., použili k dekontaminaci vody znečištěné Cu, Cd, Pb, Zn *Villarsia exaltata* a *Cyperus alternifolius*. Rostliny absorbovali kovy v rozmezí 5-25 % (Cheng a kol., 2002).

Pilon-Smiths a kol. (2002) vtypovali několik rostlinných druhů (stolístek vodní (*Myriophyllum brasiliense*), sítina (*Juncus xiphioides*), orobinec širokolistý (*Typha latifolia*), skřípina lesní (*Scripus robustus*)), které vykazovaly vysoký potenciál ve fytoemediaci selénu v mokřadech. Vhodné rostliny pro akumulaci některých těžkých kovů rhizofiltrací jsou např. kukuřice, slunečnice (*Helianthus annuus*) a rýže. Slunečnice za 24 hod. významně absorbovala kovy jako je chrom, mangan, kobalt, nikl a měď z vody. Vodní hyacint (*Eichhornia crassipes*) byl schopen nejen akumulace ale též přeměny chrómu z toxické formy Cr (VI) na netoxickou Cr (III). Rhizofiltrací vody kontaminované olovem se zabývali Schulman a kol., (1999). Vytvořili mutanty *Brassica juncea*, které měly zvýšenou schopnost akumulace olova a kadmia. Hlavním mechanismem akumulace olova je vazba na buněčnou stěnu a precipitace. Hyperakumulačních vlastností těchto mutantů bylo dosaženo zvýšením podílu buněčné stěny na váhovou jednotku kořenu, čili zmenšením buněk kořene a zvýšením jejich počtu. Pro mnoho experimentů byla použita vojtěška (*Medicago sativa*), která je schopna příjmu Pb (II), Cr (III), Zn (II), Cu (II) a Ni (II). Křídelnice (*Pteris vittata*) byla

popsána jako rostlinný druh s vysokou tolerancí k arzenu, který byla schopna akumulovat ve vysokých koncentracích v listech. Ačkoliv byla tato metoda použita pro čištění vod kontaminovaných těžkými kovy, je snadné si představit její využití i při odstraňování organických polutantů z vodního prostředí (Cunningham a Ow, 1996). Rhizofiltrace se ukázala jako zvláště vhodná při záchytu radionuklidů. Eapen a kol., používali kořenové kultury *Brassica juncea* a *Chemopodium amaranticolor* k odstranění uranu z roztoků. *B. juncea* nasorbovala 20-23 % U a *C. amaranticolor* 13 % z 5000 μM roztoku. 500 μM roztok neměl ani po deseti dnech vliv na růst kořenů (Eapen a kol., 2003). Dushenkov a kol.(1997) se také zabývali odstraňováním uranu z radioaktivních vod pomocí *B. juncea* a *Helianthus annuus*.

1.5.3 Fytovolatilizace

Fytovolatilizaci lze považovat za speciální případ fytotransformace, kdy jsou těkavé látky uvolněny rostlinou do atmosféry spolu s vodní párou při transpiraci. Některé organické polutanty, které nejsou reaktivní v podpovrchové vrstvě půdy, mohou velmi rychle reagovat v atmosféře s hydroxylovými radikály. Jen velmi málo kontaminantů je dostatečně ve vodě rozpustných a netoxických pro rostlinu a současně těkavých, aby bylo možno uvažovat o jejich volatilizaci (Singh 2003; Davis a kol., 2002). Mezi tyto výjimky patří TCE, PCBs a těkavé prvky (např. rtuť a selen). Příkladem mohou být pokusy na topolu, u kterého byla pozorována volatilizace 90 % přijatého TCE (Newman a kol., 1997). Některé mikroorganismy také mohou enzymaticky redukovat rtuťnaté ionty na kovovou rtuť, která se díky svým fyzikálním vlastnostem rozptýluje do okolí ve formě par. Gen kódující reduktasu rtuti se podařilo vnést do genomu huseníčka Thalova (*Arabidopsis thaliana*), a také do genomu liliovníku tulipánokvětého (*Liriodendron tulipifera*). Expresí tohoto genu se zvýšila odolnost rostlin vůči koncentraci Hg^{2+} iontů v jejich tkáních a současně se podařilo převést větší část rtuti do ovzduší. V případě použití tohoto způsobu musí však být realizováno opatření, které by zamezilo nekontrolovanému rozptylu plyných zplodin. Vedle výběru rostlin a klasických šlechtitelských metod jsou genové manipulace technikou, která může výrazně přispět k lepšímu využití rostlin pro fytoremediační účely.

1.5.4 Fytostabilizace

V rámci této metody rostliny snižují pohyblivost kontaminantu v prostředí pomocí svého křenového systému. Kořeny zeminu zpevní, a mohou také kontaminant sorbovat a dále jej akumulovat ve svých pletivech. Pokrytí povrchu zelenými rostlinami také značně sníží erozi a tím i ohrožení organismů uvolněnými kontaminanty. Tato metoda je vhodná pro rozsáhlá znečištění, jakými jsou odpadní haldy, odkaliště, kontaminované sedimenty atd.

Rostliny mohou stabilizovat kontaminanty ve svých orgánech pomocí:

- redoxních přeměn (např. redukce Cr^{VI} na Cr^{III})
- převedení kontaminantů do nerozpustné podoby (např. olovo ve vazbě s fosfátem)
- zabudování do rostlinných struktur

Vera Tome a kol. (2002) zkoumal ve svých studiích transportní faktory radionuklidů (Bq.kg^{-1} suchých rostlin na Bq.kg^{-1} suchého substrátu) v blízkosti uranových dolů ve Španělsku pro různé druhy trav (*Fabaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae*). Odebrané vzorky obsahovaly izotopy radia, uranu a thoria. Nejvyšší příjem byl zjištěn u Ra korespondující s množstvím transportovaných esenciálních prvků (Ca, Mn, P). Punshon a kol. (2003) zkoumal distribuci uranu a niklu v blízkosti bývalé usazovací nádrže, která vytéká do říčního systému řeky Savannah v USA. Analýzou vzorků sedimentů, listů, trav a myší bylo zjištěno, že distribuce znečištění je velice malá, a že kontaminanty jsou v lokalitě imobilizovány především v travních porostech. Obecně je cílem této biotechnologie znemožnění nebo výrazné omezení přenosu kontaminantů do okolí. Metoda se využívá i jako závěrečný krok úpravy ploch sanovaných jinými technologiemi (Punshon a kol., 2003; Vervaeke a kol., 2001; Stoltz a Greger, 2002).

1.5.5 Fytodegradace

Při použití této technologie rostliny a s nimi asociovaná mikroflóra detoxikují především organické látky pomocí enzymatického aparátu. Podmínkou účinné fytodegradace je, aby produktem metabolických aktivit byla látka netoxická nejen pro rostliny, ale i pro ostatní organismy.

Rostliny vylučují svými kořeny do okolní rhizosféry množství exudátů, ve kterých jsou obsaženy např. sacharidy, aminokyseliny a jiné organické sloučeniny. Tyto látky mohou sloužit jako zdroj energie pro mikroorganismy žijící ve rhizosféře a tak umožňovat rychlý

nárůst jejich populací. Naopak mikroorganismy mohou svými metabolickými pochody poskytnout rostlinám takové látky, které rostliny nejsou schopny samy syntetizovat. Rhizosféra je tedy díky vzájemnému vztahu rostlin a mikroorganismů metabolicky velmi aktivní oblastí, v níž může probíhat mnoho klíčových reakcí důležitých při dekontaminaci (Siciliano a kol., 1998; Johnson a kol., 2004).

Fytodegradace byly dosud použity jako remediační metoda při kontaminacích následujícími typy látek:

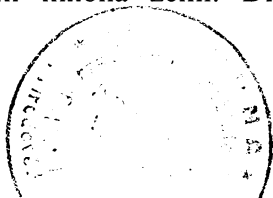
- ropné produkty (TPH)
- polyaromatické uhlovodíky (PAH)
- chlorované pesticidy
- jiné chlorované látky – (PCB), (TCE)
- výbušniny a další nitrolátky
- organofosátové pesticidy
- detergenty

1.5.6 Fytoremediace výbušnin

Současné remediační technologie pro místa kontaminovaná výbušninami zahrnují spalování, zavážení a kompostování. „Zavážení“ se pouze přemístí neošetřená půda na jiné místo a při kompostování nedochází k úplné remediaci (Peterson 1998). Pro plochy kontaminované TNT byly zkoušeny i jiné biotechnologie např. přidávání mikroorganismů do kontaminované půdy. Tato metoda však vyžaduje přidávání aditiv k povzbuzení růstu šlechtěných mikroorganismů v konkurenčním prostředí. Využití bioreaktoru se zdá jednou z použitelných možností. Ovšem tato metoda je dosti drahá, protože zahrnuje přesun kontaminované půdy do bioreaktoru. (Rosser 2001, Burken 2000).

V laboratorním „slurry“ reaktoru čistili půdu anaerobním procesem. Po fermentaci glukosy na etanol, acetát a propionát, anaerobní bakterie kompletně zredukovaly nitroskupiny TNT a vzniklých aminoderivátů, což vedlo k ireverzibilnímu navázání redukováných produktů na půdní elementy. K mineralizaci fermentačních produktů byl zapotřebí následný oxidační proces. Analýzami byla potvrzena 99 % úspěšnost.

Výzkumy se zaměřují především na TNT, jehož celosvětová produkce sice výrazně klesá, ale díky velkému rozšíření využití v minulém století jsou kontaminované plochy obrovským problémem mnoha zemí. Díky vazbě TNT na huminy a jíly, neproniká



kontaminace příliš hluboko, a proto se zdá použití fytoředičních technik výhodné. Nitraminy však pronikají hlouběji, takže pro fytoředičaci těchto látek by musely být vybrány rostliny hluboko kořenící (Li, 1997).

Pro čištění odpadních vod byly navrženy různé vodní a mokřadní systémy již před mnoha lety (Cunningham a kol., 1995). Best a kol. (1999a,b) sledovali příjem TNT a RDX vodními a mokřadními rostlinami po zálivce odpadní vodou z továrny na výrobu munice (Milan Army Ammunition Plant). U ponořených druhů pozorovali vyšší příjem kontaminantů než u rostlin emerzních. „Přirozenou“ ředičaci TNT v umělém mokřadu osazenou řeřichou (*Lepidium sativum*) popsal Gerth a kol. (2003). Úspěšně bylo zredukováno 45 % TNT a u 2,6-DNT bylo dokonce zredukováno 80 % původního množství látky. Významného zvýšení účinnosti (na 95 %) se podařilo dodáním melasy jako zdroje uhlíku. Betts (1998) vytvořil umělý mokřad na území „Iowa Army Ammunition Plant“, který osázel třemi vodními druhy rostlin (rdestem vzplývavým (*Potamogeton natans*), marantou třtinovou (*Marantha leuconeura*), růžkatcem ponořeným (*Ceratophyllum demersum*). Na konec mokřadu nasázel topoly černé (*Populus nigra*). Tento systém čistil odpadní vodu z továrny s výkonem 0,019 mg.dm⁻³ TNT za den. Problémem zůstávají rezidua pevně vázána na buněčnou stěnu. Na rozdíl od nitroaromatických herbicidů, kde byla potvrzena jejich neškodnost, toxicitou látek vzniklých degradací TNT, RDX či HMX se dosud nikdo nezabýval.

Další laboratorní studie by se měly zabývat identifikací všech produktů účastnících se degradace a stanovit kompletní hmotnostní bilance v rostlině, objasnit mechanismus fytoředičnosti .

1.5.7 Výhledy

Mnohé nové strategie ve fytoředičaci jsou založeny na využití velkého počtu dobře charakterizovaných enzymů mikrobiálního či živočišného původu. Např. lidský cytochrom P-450 2E1 se účastní detoxikace TCE, etylén dibromidu, carbon tetrachloridu, chloroformu a vinil chloridu. Transgenní tabáky s vnesenými geny pro expresi tohoto enzymu, zvýšily účinnost metabolismu TCE 100 krát a u těchto rostlin byl pozorován i zvýšený příjem a degradace etylendibromidu (Doty a kol., 2000). Zvýšení resistance (cca 10 krát) a efektivnosti degradace TNG a TNT dosáhli French a kol. (1999) vnesením genů pro expresi bakteriální NADPH-dependentní nitroreduktázy do mladých rostlin tabáku. Kuramata transformoval *Arabidopsis thaliana* geny z *Eschericia coli* kódující produkci nitroreduktasy (E.C.1.6.99.7).

Transgenní rostliny vykazovaly oproti kontrole vyšší rezistenci na přítomnost TNT v mediu a vyšší fytořediační aktivitu. (Cherian a kol.,2005).

Dalším způsobem, jak zefektivnit fytořediační technologie je přítomnost bakterií podporujících růst používaných rostlin. Tyto bakterie mohou rostlinám pomáhat fixací vzdušného dusíku, syntézou fytohormonů, zvýšením dostupnosti železa a fosforu atd. Nepřímá podpora růstu pak spočívá v odstranění negativního efektu fytopatogenních organismů v rhizosféře (Glick, 2003).

2 Cíl disertační práce

V posledních letech se výrazně zvyšuje obsah xenobiotik v přírodě. Kromě těžkých kovů, se uvolňuje do půdy, vody a ovzduší mnoho synteticky připravených organických látek (pesticidy, barviva, rozpouštědla, vedlejší produkty petrochemického a chemického průmyslu), které mohou škodlivě působit na živé organismy. Příkladem znečištění je i rozsáhlá kontaminace půdy a následně vod výbušninami (nitrolátkami). Jedná se především o trinitrotoluen, dinitrotoluen, hexahydroxytrinitrotriazin, trinitroglycerol a další. Tyto látky podle posledních výzkumů mohou být částečně degradovány, transformovány nebo akumulovány do rostlinných pletiv a orgánů. Díky tomu se jeví výhodné hledat perspektivní druhy rostlin se zvýšenou schopností přeměny a akumulace těchto látek nebo vytvářet rostliny vhodně geneticky modifikované a pěstovat je za účelem odstraňování nebezpečných organických sloučenin a toxických kovů z půdy a odpadních vod. Nezbytným předpokladem využití těchto metod je podrobná znalost mechanismu degradace těchto látek v rostlinném metabolismu.

Cílem mé disertační práce se proto stalo:

- ❖ **Sledování metabolických přeměn vybraných nitrolátek rostlinami s využitím tkáňových kultur**
- ❖ **Porovnání toxicity nitrolátek a jejich degradačních produktů**
- ❖ **Izolace enzymu podílejícího se na redukci trinitrotoluenů**
- ❖ **Ověření praktického využití rostlin pro fytořediační účely**

3 Materiál a metody

3.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL

3.1.1 Rostliny kultivované in vitro

Tkáňové kultury použité v experimentech byly převážně kultivovány na kultivačním mediu MS (Murashige a Skoog, 1962) s přidavkem různých růstových regulátorů. Složení základních složek media je uvedeno v následující tabulce (Tab.5.). Rozdíl mezi tekutým a pevným mediem byl pouze v přidavku 8 g agaru na litr media. Medium bylo sterilizováno 25 minut při teplotě 120 °C a tlaku 1.2 kPa. Veškeré manipulace se sterilním materiálem byly prováděny v boxu s laminárním prouděním.

Tab.5. Složení kultivačního média MS pro in vitro kultivace.

Makroživiny [mg.dm ⁻³ media]	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	KH ₂ PO ₄	170
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	332
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	74
Mikroživiny [mg.dm ⁻³ media]		
	H ₃ BO ₄	6.200
	KI	0.830
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.250
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025
	MnSO ₄ x 5 H ₂ O	24.000
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8.600
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025
	Na ₂ EDTA	37.300
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27.800
Vitaminy [mg.dm ⁻³ media]		
	inositol	100.0
	thiamin	0.4
Cukr [g.dm ⁻³ media]		
	sacharosa	30.0
	pH	5.7

Semena *Saponaria officinalis* L. (Mydlice lékařská) byla získána z rostlin rostoucích v místě kontaminovaném TNT. Semena byla sterilizována ponořením v 10 % roztoku Savo (5 % NaClO) po dobu 10 min, následně byla promyta sterilní vodou. Klíčení probíhalo na agarovém MS mediu bez přídavku hormonů při 25°C ve tmě. Po 5-ti dnech od vysetí byly kultury pěstovány při v 16 hod. fotoperiodě. Semenačky byly přesazeny na nové medium po dvou týdnech. Kalusová kultura byla odvozena z částí listů a stonku. Tvorba kalusu byla indukována přidáním růstových regulátorů 2,4-D (1,12 mg.dm⁻³), BAP (0,5 mg.dm⁻³) a KIN (0,43 mg.dm⁻³) do pevného media. Kalusové kultury byly dále pasážovány v intervalu dvou týdnů na světle i ve tmě. Pro sledování biotransformace nitrosloučenin byla z kalusové kultury odvozena i kultura suspenzní, která byla kultivována v Erlenmayerových baňkách ve tmě na stejném kultivačním mediu jako kalus, avšak bez přídavku agaru. Baňky byly umístěny na třepačce s kruhovým pohybem s rychlostí otáček 120 min⁻¹ (Obr.10.).



Obr.10. Suspenzní buněčná kultura *Saponaria officinalis* L.

Semena *Cannabis sativa* L. (konopí seté odrůda Beniko) byla dodána firmou Agritec s.r.o., Šumperk. Semena byla odmaštěna v 70 % etanolu po dobu 1 minuty a povrchově sterilizována v 1 % roztoku chlornanu sodného s kapkou detergentu TWEEN 20. Po uplynutí 30 minut byla semena 3x omyta sterilní vodou a umístěna na pevné SH medium (Tab.6.) bez růstových hormonů. Po 10 dnech začala semena klíčit (Obr.11.). Kalusová kultura byla získána z primárního kalusu, vytvořeném na listových a stonkových segmentech

odříznutých z 8 týdenních semenáčků po přidání růstových regulátorů 2,4-D (0,225 mg.dm⁻³) a TDZ (0,02 mg.dm⁻³). Vzniklá kalusová kultura byla pasážována se 14 denní periodou. Z kalusu byla odvozena suspenzní kultura, která byla dále pěstována se subkultivačním intervalem 14 dní v Erlenmayerových baňkách ve tmě při 24°C. Baňky byly umístěny na třepače s rychlostí otáček 120 min⁻¹.

Tab.6. : Složení kultivačního media SH (Schenk a Hildebrand, 1972).

Makroživiny [mg.dm ⁻³ media]	NH ₄ H ₂ PO ₄	300
	KNO ₃	2500
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	200
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	400
	H ₃ BO ₄	5.000
Mikroživiny [mg.dm ⁻³ media]	KI	1.0
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,10
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10
	MnSO ₄ x 5 H ₂ O	13.20
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1.0
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,20
	Na ₂ EDTA	20
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	15
	kys. nikotinová	5
Vitaminy [mg.dm ⁻³ media]	thiamin	5
	pyridoxin	0,5
Cukr [g.dm ⁻³ media]	sacharosa	30.0
	pH	5.7



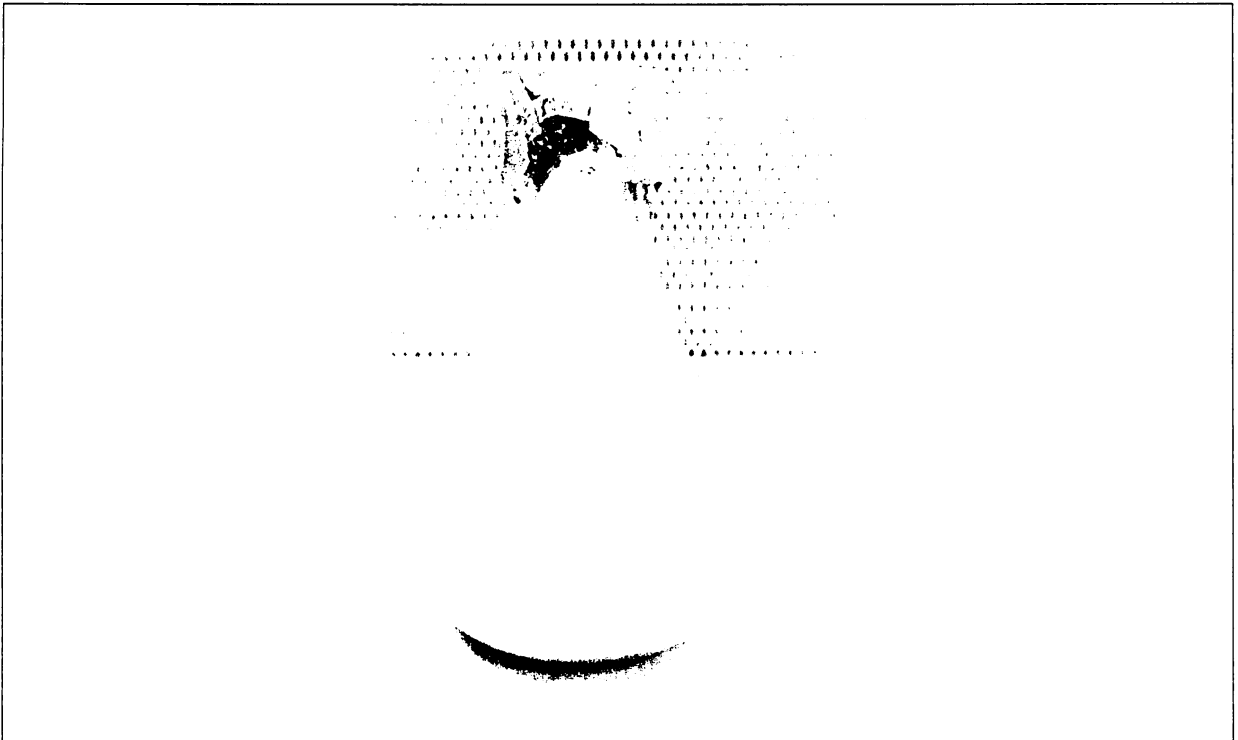
Obr.11. Kvetoucí in vitro kultura semenáčku *Cannabis sativa* L

Explantátová kultura *Populus nigra* L. (topol černý) byla získána z Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti; v naší laboratoři byla dále pěstována v kultivačních boxech (Magenta) na pevném MS mediu bez přídavku hormonů a udržována subkultivací při stálé teplotě 24°C a při 16 hod. světelné periodě. Rostliny byly subkultivovány z nodálních segmentů každých 6 týdnů. Pro experimenty byly rostliny převedeny na tekuté MS medium bez regulátorů růstu, kde po dvou týdnech spontánně vytvořily kořeny (Obr.12.). Kalusová kultura topolu byla odvozena z rozřezaných částí listových čepelí přídavkem růstových regulátorů 2,4-D (0,225 mg.dm⁻³) a KIN (0,2175 mg.dm⁻³) do kultivačního media. Vzniklý primární kalus byl přenesen do tmy na agarové medium se stejným obsahem růstových regulátorů a dále byla nově narostlá kalusová kultura pravidelně pasážována v intervalu 14 dnů. Pro experimentální práci byla odvozena buněčná suspenzní kultura, která byla pěstována v Erlenmayerových baňkách v tekutém MS mediu se stejnými růstovými regulátory, ve tmě při 24°C. Baňky byly umístěny na třepačce s kruhovým pohybem s rychlostí otáček 120 min⁻¹.



Obr.12. *In vitro* kultura regenerantu *Populus nigra* L.

In vitro kultura *Linum usitatissimum* L. (len setý) odrůda Viola, byla získána vyklíčením semen dodaných firmou Agritec s.r.o., Šumperk. Semena byla odmaštěna v 70 % etanolu po dobu 1 minuty a povrchově sterilizována v 1 % roztoku chlornanu sodného s kapkou detergentu TWEEN 20. Po uplynutí 30 min. byla semena 3x omyta sterilní vodou a umístěna na pevné MS medium bez růstových hormonů. Po 10 dnech začala semena klíčit. Kalusová kultura byla získána z primárního kalusu, vytvořeném na listových a stonkových segmentech odříznutých ze semenáčků po přidání růstových regulátorů 2,4-D ($0,225 \text{ mg.dm}^{-3}$) a KIN ($0,2175 \text{ mg.dm}^{-3}$). Vzniklá kalusová kultura byla pasážována se 14 denní periodou. Z kalusu byla odvozena suspenzní kultura, která byla dále pěstována se subkultivačním intervalem 14 dní v Erlenmayerových baňkách ve tmě při 24°C . Baňky byly umístěny na třepačce s kruhovým pohybem s rychlostí otáček 120 min^{-1} (Obr.13.).



Obr.13. Suspenzní buněčná kultura *Linum usitatissimum* L.

In vitro kultury *Populus tremula x tremuloides* (hybrid Topol osika) pocházejí z Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti v Praze. Kultury byly pěstovány v umělohmotných kultivačních boxech na mediu MS, bez přidavku růstových regulátorů při 16 hodinové světelné periodě, teplotě 24°C. Nové kultury byly získávány z vzrostlých vrcholků mateřských rostlin (Obr.14.).



Obr. 14. *In vitro* kultura regenerantu *Populus tremula x tremuloides*. (za účelem fofoografování vyndána z kultivační nádoby)

In vitro kultury ***Phragmites australis*** (Cav. Trin.ex Steudel) (**rákos obecný**) a ***Juncus inflexus*** L. (**sítina sivá**) byly získány od firmy BIOPLANTA, Německo. Rostlinky byly pěstovány na mediu SG (Tab.7.). Přítomností BAP (5 mg.dm^{-3}) v mediu byla u kultur potlačena tvorba kořenového systému. Rostliny použité pro biotransformační pokusy byly z původního media SG převedeny na bezhormonové medium MS, kde spontánně vytvořily kořeny (Obr.15. a 16.). Kultury byly množeny oddělováním nových trsů. Subkultivační interval byl 6-8 týdnů.

Tab.7. Složení kultivačního media pro in vitro kultivace mokřadních rostlin
(Sangwan a Gorenflot , 1975)

Makroživiny [mg.dm ⁻³ media]	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	KH ₂ PO ₄	170
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	332
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	74
Mikroživiny [mg.dm ⁻³ media]		
	H ₃ BO ₄	10.000
	KI	0.830
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.250
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025
	MnSO ₄ x 5 H ₂ O	25.000
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10.000
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025
	Na ₂ EDTA	37.300
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27.800
Vitaminsy [mg.dm ⁻³ media]		
	inositol	100.0
	thiamin	0.4
	kys.nikotinová	1.0
	pyridoxin	1.0
Růstové regulátory [g.dm ⁻³ media]	BAP	0,005
Cukr [g.dm ⁻³ media]	sacharosa	30.0
	pH	5.7



Obr. 15. *Juncus inflexus* - in vitro kultura



Obr. 16. *Phragmites australis* - in vitro kultura.

Semena *Senecio jacobaea* L. (Starček přímětník) pocházela z Německa z Duisburgu, z místa kontaminovaného TNT. Semena byla sterilizována ponořením v 10% roztoku Savo (5% NaClO) po dobu 10 min, následně byla promyta sterilní vodou. Klíčení probíhalo na agarovém MS mediu bez přidavku hormonů při 25°C ve tmě. Po 5-ti dnech od vysetí byly kultury osvětleny v 16 hod. periodě. Semenáčky byly přesazeny do plastových kultivačních boxů (Magenta) na tekuté MS medium po dvou týdnech (Obr. 17.).



Obr. 17. *Senecio jacobaea* L.- in vitro kultura

3.1.2 *Kultury pěstované hydroponicky*

Sadba *Helianthus annus* L. (slunečnice roční) byla získána naklíčením semen na Petriho misce a jejich následnou kultivací na filtračním papíře s otvory pro klíčky položeném na nádobě obsahující kultivační hydroponické medium (Obr.18., Tab. 8.). Po objevení prvních pravých listů byly rostlinky opatrně vyjmuty a dále kultivovány samostatně v Erlenmayerových baňkách (250 cm³) na stejném mediu (obr.19.). Rostliny byly pěstovány při teplotě 20 °C v klimatizované místnosti se stálým světelným režimem a světelnou periodou 16 h světla/ 8 h tmy. Protože se jednalo o hydroponickou kultivaci, medium nebylo sterilizováno ani další manipulace nebyly prováděny ve sterilním prostředí.

Tab.8.: Složení kultivačního media pro hydroponické kultivace (Hoagland,1920)

Makroživiny [mg.dm ⁻³ media]	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	369.7
	K ₂ SO ₄	348.51
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	588.07
Fosfátový pufr pH 5.5 [mg.dm ⁻³ media]		
	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	291.73
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	46.56
Mikroživiny [mg.dm ⁻³ media]		
	H ₃ BO ₄	8.58
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.06
	MnSO ₄ x 4 H ₂ O	4.64
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.66
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.82
Železo [mg.dm ⁻³ media]		
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	17.92
Dusíkaté látky [mg.dm ⁻³ media]		
	NaNO ₃	339.98
	NH ₄ Cl	213.97
	NH ₄ NO ₃	160.09



Obr.18. Příprava hydroponické kultury *Helianthus annus* L. na filtračním papíře s otvory



Obr.19. Hydroponická kultura *Helianthus annus* L.

3.1.3 Rostliny kultivované in vivo

K testování účinku půdy kontaminované nitrosloučeninami byly vybrány dřeviny- *Quercus robur* L. (dub letní) a *Populus tremula* (topol osika), které se běžně vyskytovali v oblasti ze které pocházela kontaminovaná zemina. Další skupinou pak byly kulturní plodiny -*Helianthus annuus* L., *Sinapis alba* L.(hořčice bílá), *Zea mays* L.(kukuřice setá) (AROS-osiva s.r.o. Praha), -*Linum usitatissimum* odruda *Viola*, *Cannabis sativa* odruda *Beniko*

(Agritec s.r.o., Šumperk). Semena byla vyseta do umělohmotných květníků (á 20 semen) se zahradním substrátem smíchaným se zeminou kontaminovanou TNT resp. DNT v různém poměru (1:1; 7:1; 31:1). Klíčení a růst probíhal v přirozených podmínkách, rostliny byly pravidelně zavlažovány (Obr.20.).

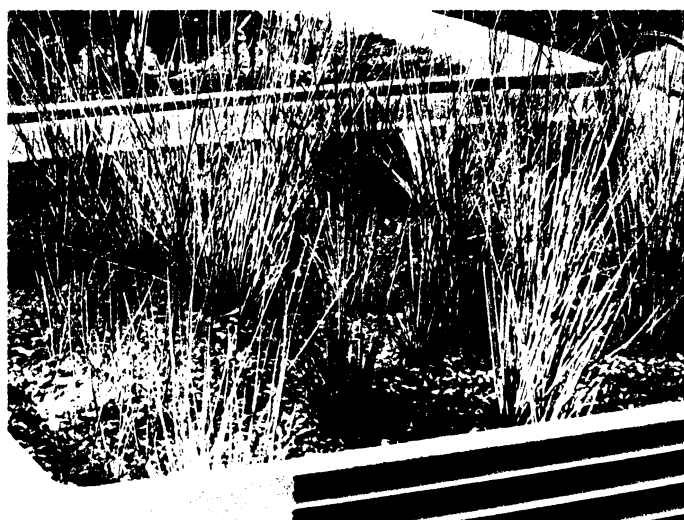


Obr. 20. Pokusné rostliny v květnících.

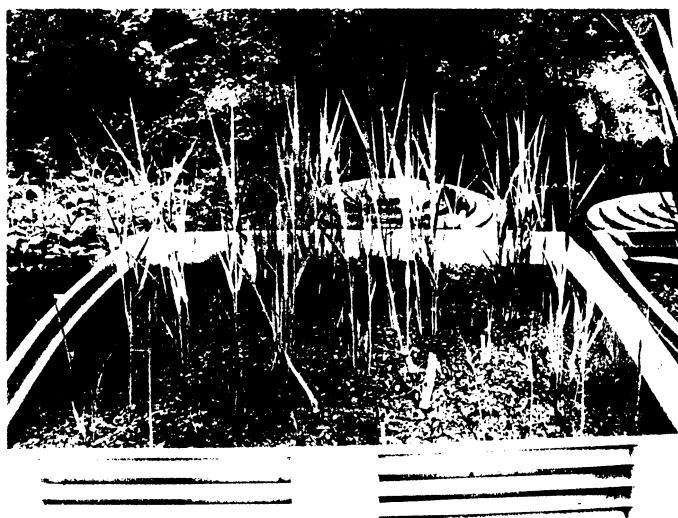
Zvláštní kapitolu tvoří mokřadní rostliny použité v umělém mokřadu k remediaci odpadních vod při výrobě výbušnin. *Pragmites australis* (Cav.) Trin.ex Steudel (rákos obecný), *Juncus inflexus* L. (sítina sivá) , *Iris pseudacorus* L. (kosatec žlutý) a *Typha laxmannii* Lepech. (orobinec sítinovitý). Rostliny zakoupené ve firmě Pěstírna vodních a bahenních rostlin, Kostelní Lhota, byly pěstovány v kontejnerech vyplněných štěrkem, vodní hladina dosahovala po okraj násypu (Obr.21.- 24.)



Obr.21. Typha laxmannii Lepech. (orobinec sítinovitý)



Obr.22. Juncus inflexus L. (sítina sivá)



Obr.23. *Phragmites australis* (Cav.) Trin.ex Steudel (rákos obecný).



Obr.24. *Iris pseudacorus* L. (kosatec žlutý)

3.2 METODY

3.2.1 Stanovení růstového koeficientu

Nárůst biomasy kultury byl charakterizován růstovým koeficientem *GV* (*Growth Value*). Tento koeficient představuje přírůstek čerstvé biomasy vztažený na jednotku inokula či rostliny a byl stanoven gravimetrickou metodou podle vzorce:

$$GV = (m_x - m_0) / m_0$$

m_0 - hmotnost inokula nebo rostliny na počátku experimentu

m_x - hmotnost kultury nebo celé rostliny po kultivaci, kde "x" je počet dnů kultivace

3.2.2 Test inhibice elongace kořene hořčice bílé

Test byl vyvinut k testování neškodnosti odpadních vod určených pro závlahy (Čihalík *et al.*, 1989). Tato metoda sleduje vliv xenobiotik na klíčení a růst kořenů hořčice bílé (*Sinapis alba* L.) v počátečních stádiích vývoje. Metoda je založena na porovnání délky primárního kořene u klíčících rostlin po třídní kultivaci na podložkách nasycených kultivačním médiem s roztoky testované látky ve srovnání s kontrolní skupinou klíčící pouze na kultivačním médiu. Provedení testu je definováno normou ISO 7346.

Do sterilní Petriho misky (průměr 9 cm) bylo napipetováno 5 cm³ kultivačního media (Tab.9.) s přidavkem hodnocené látky. Dno misky bylo zakryto filtračním papírem, na který bylo položeno 25 semen hořčice bílé. Petriho misky byly uchovávány ve tmě a při stálé teplotě 24°C. Kultivace probíhala 3 dny. Porovnáním s kontrolou byla zjištěna inhibice růstu kořenů pro jednotlivé koncentrace. Inhibice růstu byla vypočítána podle vzorce:

$$I = (D_k - D_r) / D_k$$

I inhibice růstu

D_k průměrná délka kořene v kontrole

D_r průměrná délka kořene v testované koncentraci

Tab.9. Složení kultivačního media

Složky	Množství [g.dm ⁻³]
CaCl ₂ .H ₂ O	0,588
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2565
NaHCO ₃	0,149
KCl	0,0115

3.2.3 Stanovení obsahu nitrosloučenin a nitroesterů ve vzorcích

3.2.3.1 -pomocí HPLC

Ke stanovení obsahu nitrosloučenin v mediu a acetonovém extraktu z rostlin nebo tkáňové kultury byla nejčastěji použita metoda stanovení látek na HPLC porovnáním retenčního času a UV spektra vzorku se standardy.

Extrakce z rostlin nebo buněčné kultury probíhala 24 hodin po zhomogenizování 5 g rostlinné tkáně v 10 cm³ acetonu. Filtrát získaný filtrací přes Büchnerovu nálevku byl odpařen a odparek rozpuštěn v 1 cm³ metanolu. Pro stanovení obsahu sledovaných látek v mediu byl vzorek pro HPLC analýzu odebrán (asepticky) přímo z kultivační nádoby, pokud obsah sledovaných látek nebyl v detekčním limitu bylo medium zakoncentrováno. V tomto případě bylo medium přefiltrováno přes kolonu se sorbentem Si-C¹⁸ (SEP-PAKTM C¹⁸ cartridge for rapid sample preparation, Waters, U.S.A) a kolona byla vymyta 10 cm³ metanolu. Metanol byl odpařen na vakuové odparce při 35°C a odparek rozpuštěn v 1 cm³ metanolu. Pro separaci látek na HPLC byly použity kolony plněné reverzní fází Si-C¹⁸, 7 μm, PSI 120 (Biospher, Labio) nebo kolony plněné reverzní fází Si-C¹⁸, 5 μm (Reprosil, Waters). Pro analýzu byl zvolen lineární gradient metanolu (10 – 100 %) za 40 min při rychlosti 1 cm³.min⁻¹. Pro nástřik vzorků byl použit autosampler: SPECTRA SERIES AS 300, měření probíhalo na UV-detektoru PDA Jasco MD 1510.

Obsah nitrolátek byl vypočítán z plochy píku na chromatogramu při vlnové délce 230 nm, nitroesterů při 207 nm. Koncentrace příslušné látky ve vzorcích byla vypočítána z kalibrační křivky.

Standardy TNT, ADNT, ADNT, DANT, ANT, TNG, DNG, MNG poskytl Ústav energetických materiálů, Univerzita Pardubice, standardy DNT, DNA a DAT byly zakoupeny u firmy Sigma –Aldrich.

3.2.3.2 -spektrofotometrickou metodou (Oh a kol., 2000)

TNT je možno kvantifikovat také pomocí spektrofotometrické metody založené na barevné reakci TNT a příbuzných látek při silně alkalických podmínkách (Channon a kol., 1944). Oh a kol. zjistil, že za takových podmínek TNT významně absorbuje při vlnové délce 447 nm, ačkoliv jeho hlavní redukční produkty (2-ADNT; 4-ADNT; 2,6-DANT) při této vlnové délce žádnou absorpenci nevykazují. Tato metoda byla kombinována s použitím přístroje „multi-well ELISA reader“ s filtrem pro 450 nm. Výhodou takto kombinované metody je možnost současné analýzy velkého množství vzorků. Vzorky byly nanášeny do komůrek mikrotitračních destiček a alkalizovány přidáním 1,5 M NaOH. Po osmi minutách byla pomocí Microplate Readeru (SLT Lainstruments) změřena absorbance při 450 nm. Koncentrace TNT ve vzorcích byla vypočítána z kalibrační křivky.

3.2.4 Izolace proteinů

3.2.4.1 Příprava hrubého extraktu a precipitace.

Homogenizace buněčné kultury probíhala po zmrazení v tekutém dusíku rozetřením v předem vychlazené porcelánové misce. V průběhu homogenizace byl ke kultuře postupně přidáván extrakční pufr (*Tab. 10.*) v koncentraci $10 \text{ cm}^3 \cdot 10 \text{ g}^{-1}$ buněk a přidáván polyvinylpyrrolidon (SigmaAldrich) ($1 \text{ g} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$ buněk). Homogenizát byl promyt extrakčním pufrem a přefiltrován přes 6 – 8x složenou gázu. Filtrát byl centrifugován 30 min. při 12000 g, 4°C. Supernatant byl dále vysrážen pomocí síranu amonného $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ve dvou stupních 0-40 % a 40-80 % saturace.

Pro odsolení roztoku byla použita dialýza. Pelet byl resuspendován v 25 mM pufru Tris o pH 9 a napipetován do dialyzačního „střívka“ SERVAPOR o průměru 16 mm. Dialýza probíhala v 0,25 mM Tris -pufru o pH 9 při 4°C za stálého míchání, byly provedeny tři výměny nového pufru po 4 hod.

Tab. 10. Složení extrakčního pufru

Složky	Množství složek na 400 cm ³ pufru
TRIS 100 mM	4,84 g
Glycerol	80 cm ³
Pyrosiřičitan draselný	3,8 g
Kyselina askorbová	3,52 g
EDTA 100 mM pH 8	10 cm ³
DTT	308 mg
FAD/FMN	800 mm ³

3.2.4.2 Iontoměničová chromatografie

Skleněná kolona (2,5 x 20 cm) byla naplněna DEAE celulosou a promyta 25 mM pufrům TRIS o pH 9. Jako mobilní fáze byl použit 0,25 mM pufr Tris o pH 9, 10 % glycerol; 0,02 % azid; do pravého sloupce gradientového míchadla byl přidán chlorid draselný v konc. 3,75 g KCl na 100cm³ mobilní fáze. Chromatografie probíhala v chladu při rychlosti průtoku 20 cm³.hod. Frakce byly jímány po 2 cm³.

3.2.4.3 Stanovení koncentrace bílkovin

Koncentrace bílkovin v jednotlivých frakcích byla stanovena na základě měření absorbance vzorků na spektrofotometru UV mini 1240 (UV-VIS spektrofotometr) Shimadzu

při vlnových délkách 280 a 450 nm nebo metodou dle Bradfordové (1976). Tato metoda je založena na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue 6250 na bílkoviny, přičemž dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm. 20 mm³ vzorku bylo smícháno s 780 mm³ vody a 200 mm³ barviva Coomassie Brilliant Blue 6250, a absorbance ihned změřena na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

3.2.4.4 Stanovení nitroreduktázové aktivity

Nitroreduktázová aktivita byla stanovena na základě úbytku TNT ze směsi testovaného vzorku a reakční směsi (Tab. 11.). Reakce probíhala 2 hodiny ve vodní lázni při 30° C zastavena byla přidáním 20 mm³ metanolu. Množství TNT bylo stanoveno na HPLC.

Tab. 11. Složení reakční směsi:

vzorek	100 mm ³
25 mM Tris pufr (pH 9)	20 mm ³
15 000 U kataláza	20 mm ³
10 mM NADPH	20 mm ³
2 mM TNT	20 mm ³
voda	20 mm ³

3.2.4.5 SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

K porovnání spektra proteinů v jednotlivých frakcích byla použita SDS-PAGE (Laemmli a kol., 1970), složení gelů je uvedeno v Tab.12. Před nanesením na gel byly proteiny ve směsi s Tris-pufem o pH 7,5 a bromfenolovou modří denaturovány 10 min.ve 100°C horké vodní lázni, po vyjmutí byly vzorky prudce zchlazeny a zcentrifugovány. Jako standardy byly použity proteinové směsi 4 a 5 firmy SERVA. Elektroforéza probíhala v trisovém pufru (Tab.13), 20 min. při 20 mA a následně 50 min. při 40 mA. Po skončení elektroforézy byl gel obarven Brilliant Coomassie Blue R-250.

V případě nativní elektroforézy byl postup stejný, pouze gely neobsahovaly SDS a celá elektroforéza probíhala v chladu (4°C).

Tab.12. složení gelů

Gel A 10 % Resulting gel	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 cm ³	Gel B 6,6% Stacking gel	1 M Tris pH 6,8	1,25 cm ³
	44% AA mix	2,3 cm ³		44% AA mix	750 mm ³
	50% glycerol	1,0 cm ³		10% SDS	50 mm ³
	0,2 M EDTA	100 mm ³		10% APS	50 mm ³
	10% SDS	100 mm ³		H ₂ O	2,85 cm ³
	10% APS	50 – 100 mm ³		TEMED	5 mm ³
	H ₂ O	3,9 cm ³			
	TEMED	7 mm ³			

Tab.13. Složení trisového pufru pro elektroforézu

Tris	15,1 g
Glycin	94 g
SDS	5 g
Voda	900 cm ³

3.2.4.6 Gelová sloupcová chromatografie

K rozdělení proteinů dle hmotnosti byla použita gelová sloupcová chromatografie. V první řadě bylo nutné zakoncentrovat vzorky na co možná nejmenší objem. K tomu byla použita dialýza (dialyzační střívko SERVAPOR) proti roztoku sacharózy. Po té byly vzorky odsoleny v Tris pufru 0,025 M o pH 8 a po lyofilizaci uchovány v -80°C . Těsně před nanesením na kolonu byl vzorek rozpuštěn v 1 ml destilované vody. Skleněná chromatografická kolona (2,5 x 98 cm) byla naplněna tuhou fází- SEPHACRYL (Sigma Aldrich, USA). Příprava vzorku i chromatografie probíhaly v chladové místnosti při 4°C , rychlost průtoku 25 mM Tris-pufu o pH 8 (+ 0,2 M NaCl, 10 % glycerol, 0,004 % azid) byla $30\text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$, nasbíráno bylo 95 frakcí po 2 cm^3 .

3.2.4.7 Dvoudimenzionální elektroforéza

Extrakce proteinů z buněk byla provedena rozetřením rostlinného materiálu v třecí misce v tekutém dusíku. Proteiny byly vysráženy 10 % roztokem trichloroctové kyseliny v aceton. Dále byly proteiny rozpuštěny v solubilizačním pufru. Rehydratace IPG (immobilized pH gradient) proužku (17 cm) se vzorkem trvala 10- 12 hod. při 50 V. Následovala izoelektrická fokusace (1. rozměr 2D-ELFO), kdy jsou proteiny separovány podle izoelektrických bodů v polyakrylovém gelu. K rozdělení byly použity amfolyty pro pH v rozmezí 3,1-9,3. Izoelektrická fokusace probíhala za těchto podmínek:

1. krok: 30 min., 200 V
2. krok: 3 hod., zvyšování napětí 200 – 1500 V
3. krok: zvyšování napětí 1500- 5000 V, celkový počet volthodin: 60 000 Vh
4. krok: 15 hod., 500 V

Po ukončení fokusace byly IPG proužky ekvilibrovány v pufru obsahujícím SDS. Po přenesení proužku na kontinuální gel (*Tab.14*) druhé dimenze byl proužek přelit 0,8 % agarosou v elektroforetickém pufru s 0,002 % obsahem bromfenolové modři (*Tab.15*). Následovala SDS-PAGE (2.rozměr), kde se proteiny dělí podle molekulové hmotnosti.

Tab.14. Složení kontinuálního gelu pro 2D-ELFO

Akrylamid G30 (zásob.roztok)	9,9 cm ³
voda	12 cm ³
pufr	7,5 cm ³
10% SDS	0,3 cm ³
10% APS	150 mm ³
TEMED	10 mm ³

Tab.15. Složení elektroforetického pufru.

Tris	0,025 M
Glycin	0,192 M
SDS	0,1 %

Gely byly barveny Coomassie Brilliant Blue R 250 nebo stříbrem. Hmotnost vybraných proteinů byla stanovena za použití MALDI-TOF hmotnostního spektrometru BIFKLEX (Bruker-Franzen, Bremen, Germany)

3.2.5 Sledování distribuce ^{14}C -TNT v rostlině

Rostlinny *Senecio jacobaea* byly kultivovány v kultivačních boxech Magenta, na tekutém mediu MS s přidavkem TNT ($20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a ^{14}C -TNT (cca $1,1 \text{ MBq} \cdot \text{dm}^{-3}$). Z rostlin byla odebrána malá část kořene, která byla použita k mikrořezům. Sklizené rostliny byly zmrazeny tekutým dusíkem a rozetřeny na misce a dále extrahovány acetonem (30 cm^3) 48 hod. Po uplynutí této doby byl extrakt zakoncentrován na odparce a odparek resuspendován v 1 cm^3 metanolu. Medium bylo extrahováno pomocí kolonek se sorbentem Si-C^{18} (SEP-PAKTM C^{18} cartridge for rapid sample preparation, Waters, U.S.A), obsah kolonek byl vymyt metanolem a zakoncentrován na 1 cm^3 . Pevný zbytek po acetonové extrakci byl mineralizován v koncentrované H_2SO_4 . Vzorky ($0,1 \text{ cm}^3 + 5 \text{ cm}^3$ scintilační kapaliny Rotiszint eco plus) byly analyzovány na scintilačním spektrometru Beckman LS 6500, USA. Měření vzorků probíhalo jednu minutu a bylo automaticky zpracovááno programem pro příslušný radionuklid. Relativní aktivita byla určena výpočtem z hodnot zhášecí křivky připravené v laboratoři radionuklidů UOCHB AV ČR.

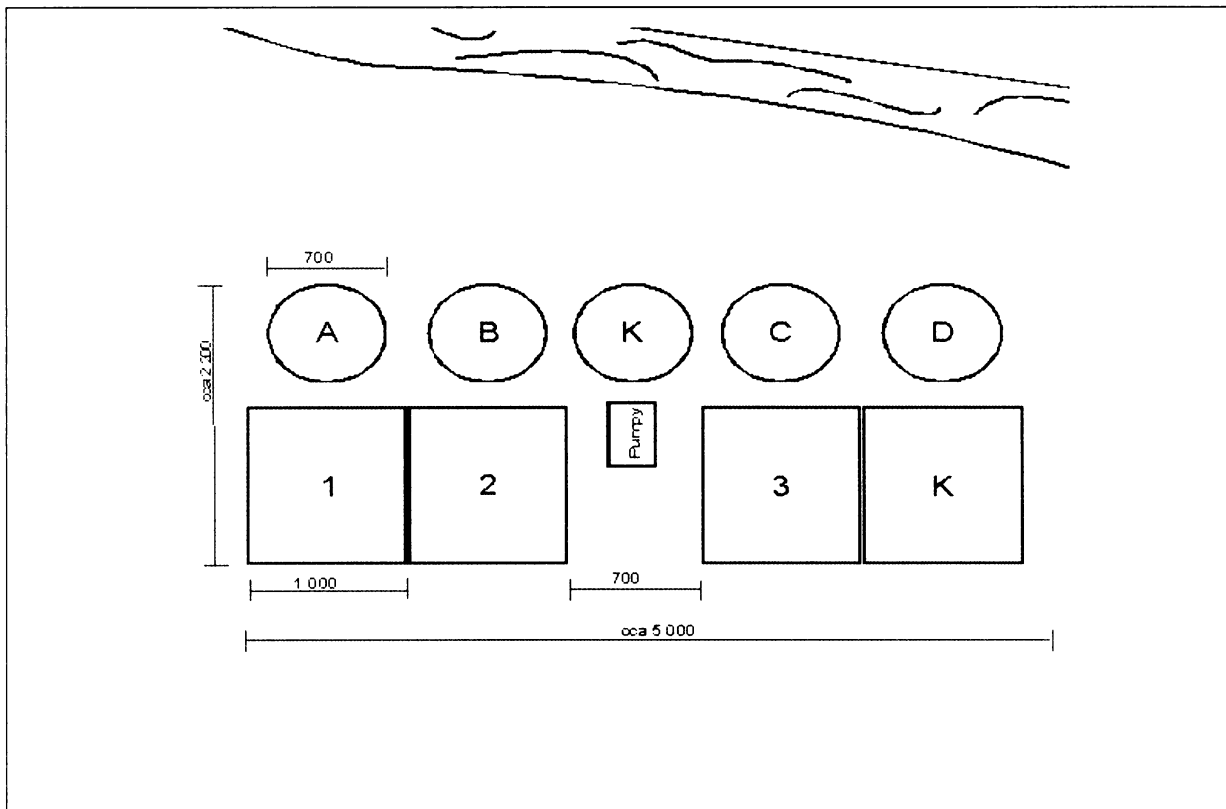
Kořenová špička byla podélně rozříznuta pomocí mikrotonu a bezové duše na řezy o tloušce přibližně $0,2 \text{ mm}$ a délce $1,5 \text{ mm}$, které byly ihned vyfotografovány na mikroskopu Leica při 80 násobném zvětšení a uloženy v radiodetekční desce do chladu -80°C . Po uplynutí tří měsíců bylo rozložení radiace v řezech vizualizováno na imageru Typhoon, Japan.

Suspenzní kultury *Saponaria officinalis* byly kultivovány v Erlenmayerových baňkách na MS mediu (20 g buněk v 50 cm^3 s přidavkem TNT ($100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a ^{14}C -TNT (cca $1,3 \text{ MBq} \cdot \text{dm}^{-3}$)). Vzorky byly odebírány v intervalu 2 h, 4 h, 8 h. Vzorek media byl získán přefiltrováním suspenze na Büchnerově nálevce. Medium bylo extrahováno pomocí kolonek se sorbentem Si-C^{18} (SEP-PAKTM C^{18} cartridge for rapid sample preparation, Waters, U.S.A), obsah kolonek byl vymyt metanolem a zakoncentrován na 1 cm^3 . Buňky byly dále promyty destilovanou vodou, zamrazeny tekutým dusíkem, rozetřeny v třecí misce na prach a extrahovány 24 hod v 30 cm^3 acetonu. Po uplynutí této doby byl extrakt zakoncentrován na odparce a odparek resuspendován v 1 cm^3 metanolu. Pevný zbytek po acetonové extrakci byl

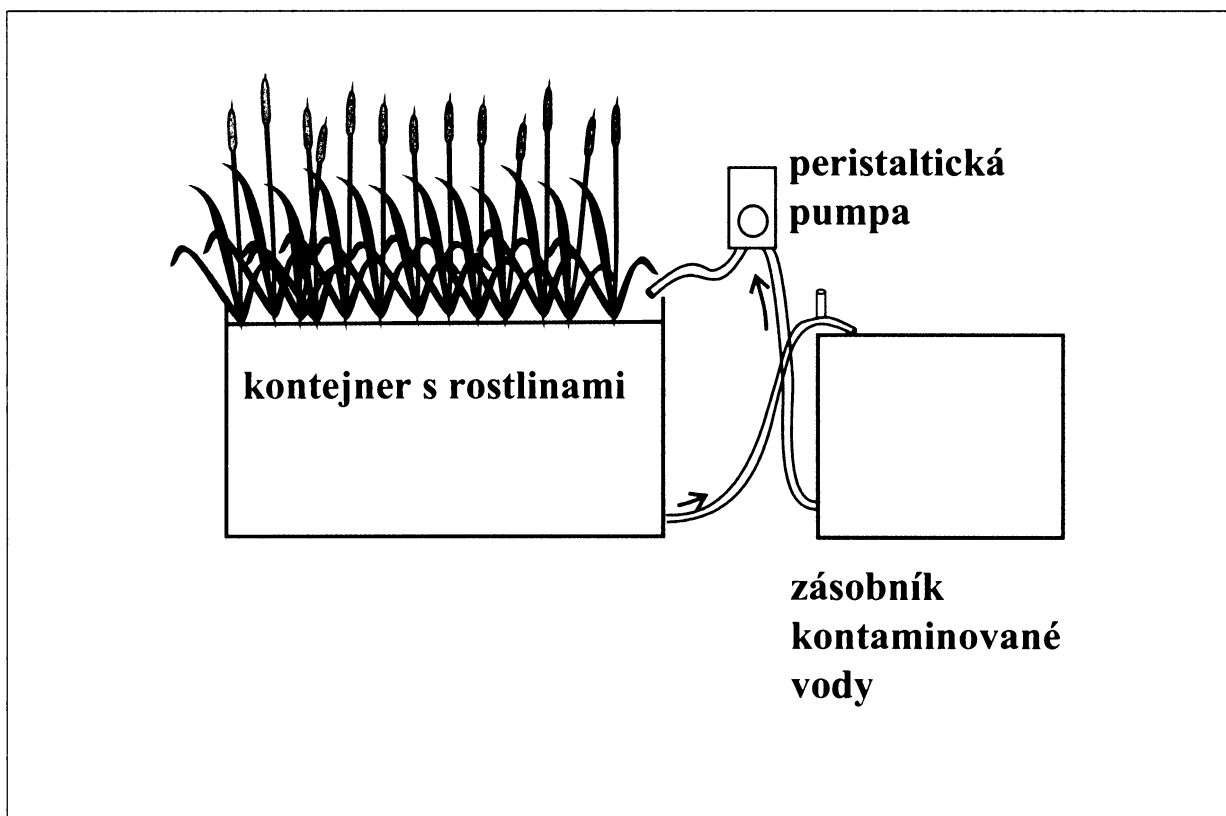
mineralizován v koncentrované H_2SO_4 . Vzorke (0,1 cm^3 + 5 cm^3 scintilační kapaliny Rotiszint eco plus) byly analyzovány na scintilačním spektrometru Beckman LS 6500, USA. Měření vzorků probíhalo jednu minutu a bylo automaticky zpracováváno programem pro příslušný radionuklid. Relativní aktivita byla určena výpočtem z hodnot zhášecí křivky připravené v laboratoři radionuklidů ÚOCHB AV ČR.

3.2.6 Konstrukce umělých mokřadů

K vytvoření modelového umělého mokřadu (2004) byly použity 4 umělohmotné kontejnery „Arca big box“ o rozměrech 1200 mm x 1000 mm x 700 mm, objemu 670 dm^3 , které byly naplněny drenáží z drcené žuly o zrnitosti 6-12 mm. Kontejnery byly opatřeny výpustními ventily. Jako zásobní sudy s kontaminovanou vodou sloužily barely o objemu 200 dm^3 (Obr.25.). Plynulou cirkulaci vody ($70 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) mezi zásobními sudy a kontejnery zajišťovala peristaltická čerpadla (Obr. 26.). Kontejnery byly v prvním roce osazeny těmito mokřadními druhy rostlin: *Pragmites australis* (rákos obecný), *Juncus inflexus* (sítina sivá) a *Typha laxmannii* (orobinec sítinovitý). V následujícím roce byl prázdný kontejner sloužící jako kontrola osazen druhem *Iris pseudacorus* L. (kosatec žlutý). Vzorke na analýzu obsahu nitroesterů a dusičnanů v systému byly odebírány z přítokové hadice.

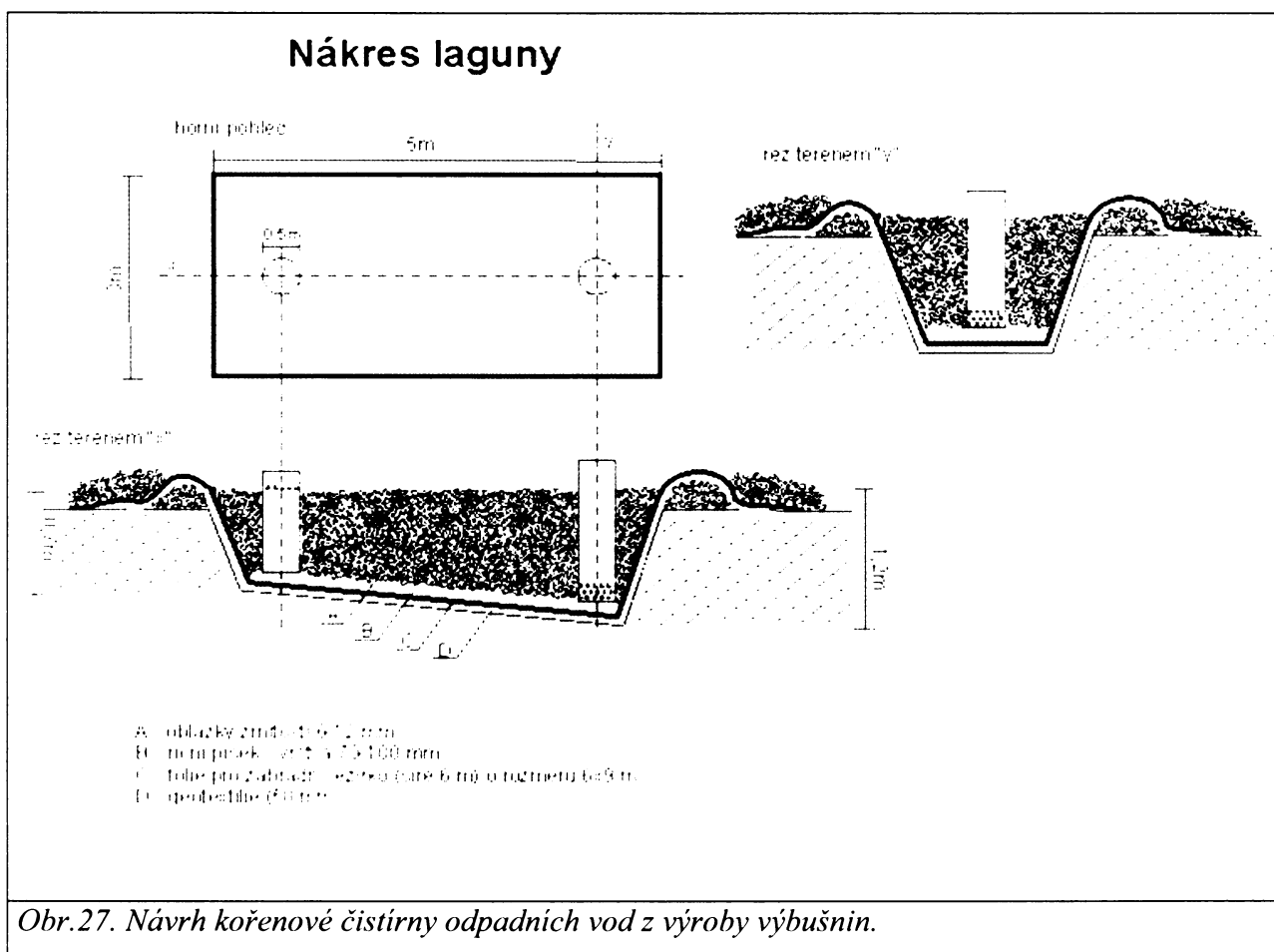


Obr.25. Nákres modelového mokřadního systému. 1,2,3- kontejnery s rostlinami; K- kontejner bez rostlin; A,B,C,D – sudy kontaminovanou vodou.



Obr.26. Nákres cirkulace vody mezi jednotlivými zásobníky a kontejnery.

V roce 2005 byla vytvořena a dána do provozu kořenová čistírna odpadních vod („laguna“) zkonstruována dle nákresu (Obr.27.). Stěny čistírny tvoří podklad z geotextilie a folie pro silážní jámy. Mokřad (objem = 5384 dm³) je naplněn oblázky, k cirkulaci kontaminované vody ze zásobníku slouží roury z PVC děrované v horní resp. dolní části. Přečerpávání vody je zajištěno externím čerpadlem. V květnu byla čistírna napuštěna pitnou vodou a osázen mokřadními druhy rostlin : *Pragmites australis* (rákos obecný), *Juncus inflexus* (sítina sivá) a *Typha laxmannii* (orobinec sítinovitý). V tomto roce proběhly dva čistící cykly.



3.2.6.1 Stanovení dusičnanů

Stanovení dusičnanů ve vzorcích z umělých mokřadů bylo založeno na reakci dusičnanů s 2,6-dimethylfenolem v přítomnosti kyseliny sírové a kyseliny fosforečné za

vzniku cihlově červeného 4-nitro-2,6-dimethylfenolu (Sýkora a kol., 2002). Do 500 mm⁻³ bylo přidáno 50 mm⁻³ kyseliny amidosírové (eliminace rušivého vlivu dusitanů) a po důkladném protřepání přidáno 3,5 cm³ směsi kyselin (H₂SO₄ : H₃PO₄ = 1 : 1). K takto připravenému vzorku byl přidán 2,6-dimethylfenol (500 mm⁻³) a po 10 min byla spektrofotometricky změřena intenzita zbarvení vzorku při vlnové délce 324 nm.

4 Výsledky

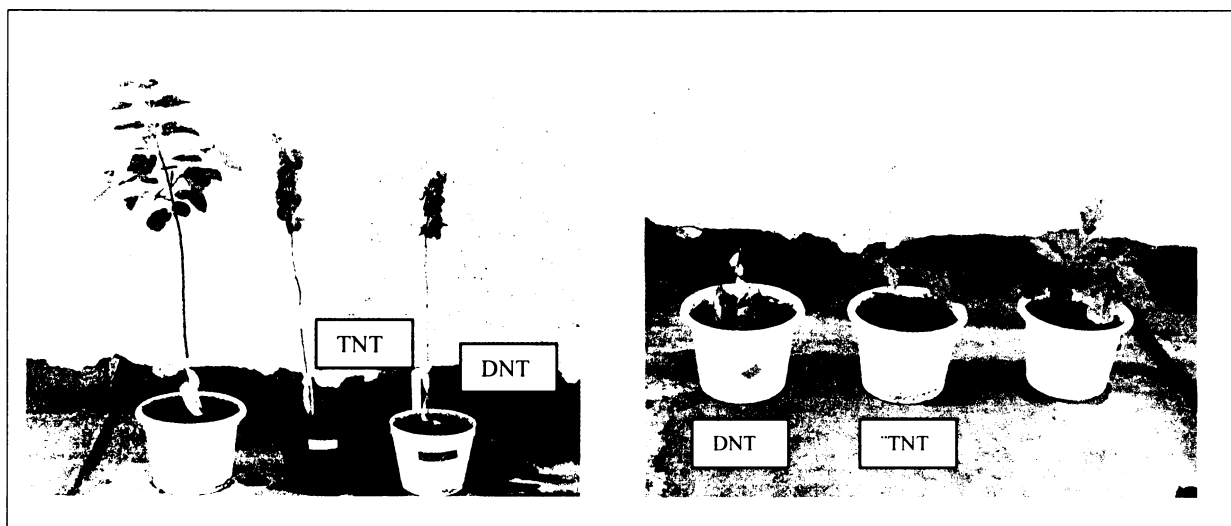
1.1. PŮSOBENÍ TNT A DNT NA RŮST ROSTLIN

1.1.1. Vliv TNT a DNT na klíčení a růst kulturních plodin

Vliv 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) resp. 2,4-dinitrotoluenu (DNT) obsažených v zemině na klíčení a růst rostlin byl testován na kulturních plodinách *Helianthus annuus* L., *Sinapis alba* L., *Zea mays* L., *Linum usitatissimum* odrůda *Viola* a *Cannabis sativa* odrůda *Beniko*. Zemina byla smíchána se zahradnickým substrátem v poměru 1:1, upravená zemina obsahovala v 1g půdy přibližně 0,93 mg TNT, resp. 4,75 mg DNT. Klíčivost při takto vysoké kontaminaci byla silně potlačena, vyklíčila pouze semena kukuřice (40 %) a slunečnice (14 %) na zemině kontaminované TNT (Tab.16.). Současně byly vystaveny fyto toxickému účinku vybraných látek semenáčky dubu letního (*Quercus robur*) a osiky (*Populus tremula*). Přesazením do kontaminované zeminy byl jejich růst silně potlačen v případě TNT, v případě DNT došlo po 14 dnech až k úplnému seschnutí a odumření rostlin (Obr.28.).

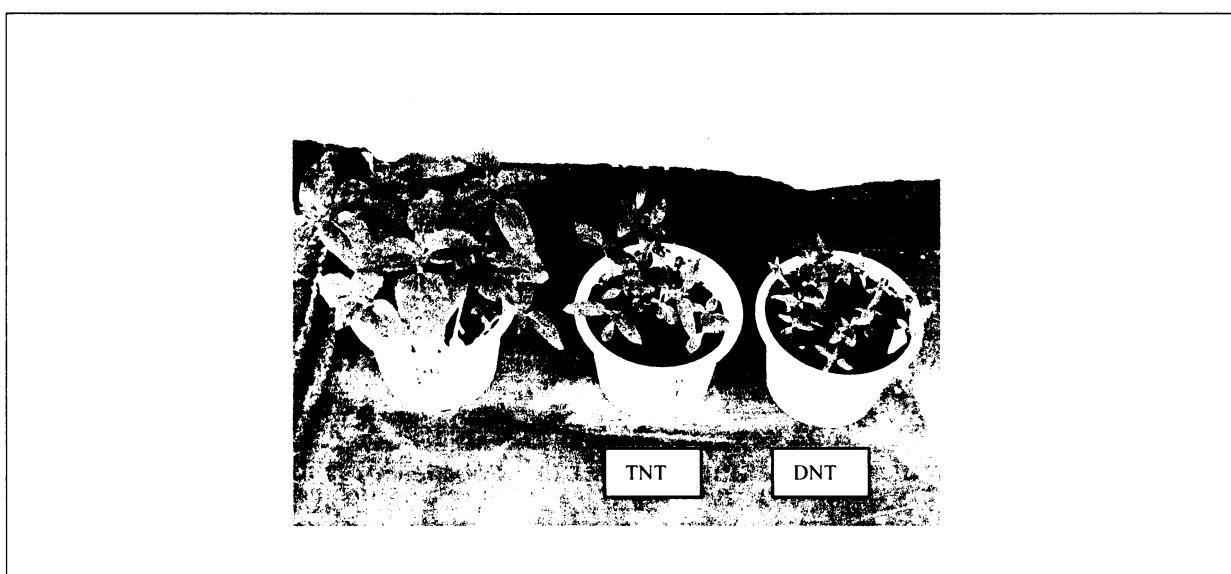
Tab.16. Klíčivost semen (%) na půdě kontaminované DNT, TNT. (x- hodnoty neměřeny)

	kontrola	DNT 4,75mg	TNT 0,928mg	DNT 1,358mg	TNT 0,264mg	DNT 0,252mg	TNT 0,0969mg
slunečnice	65,0	0	14	32,5	50	67,5	72,5
kukuřice A	26,7	x	x	0	26,7	20,0	20,0
kukuřice B	93,3	0	40	x	x	x	x
len	95,0	0	0	0	67,5	100,0	97,5
hořčice	95,0	0	0	0	0	75,0	85,0
konopí	60,0	0	0	0	0	52,5	40,0



Obr.28. Semenáčky topolu osiky a dubu letního po 14 denní kultivaci na půdě kontaminované TNT ($0,93 \text{ mg.g}^{-1}$) a DNT ($4,75 \text{ mg.g}^{-1}$).

V následujícím pokusu byla tato zemina znovu smíchána se zahradním substrátem a to v poměru 1:3 (výsledná koncentrace TNT $0,264 \text{ mg.g}^{-1}$, DNT $1,358 \text{ mg.g}^{-1}$). Díky snížení kontaminace vyklíčila na půdě kontaminované TNT semena nejen slunečnice a kukuřice, ale i lnu. Růst však byl ve srovnání s kontrolami silně potlačen. Koncentrace DNT byla pro většinu semen příliš toxická (Tab.16.). Zvýšená odolnost byla pozorována u slunečnice, jejíž semena vyklíčila z více než 30 % (Obr. 29.). Pokus byl ukončen po 2 měsících.



Obr.29. Slunečnice roční rostoucí 14 dnů na půdě kontaminované TNT $0,264 \text{ mg.g}^{-1}$, DNT $1,358 \text{ mg.g}^{-1}$

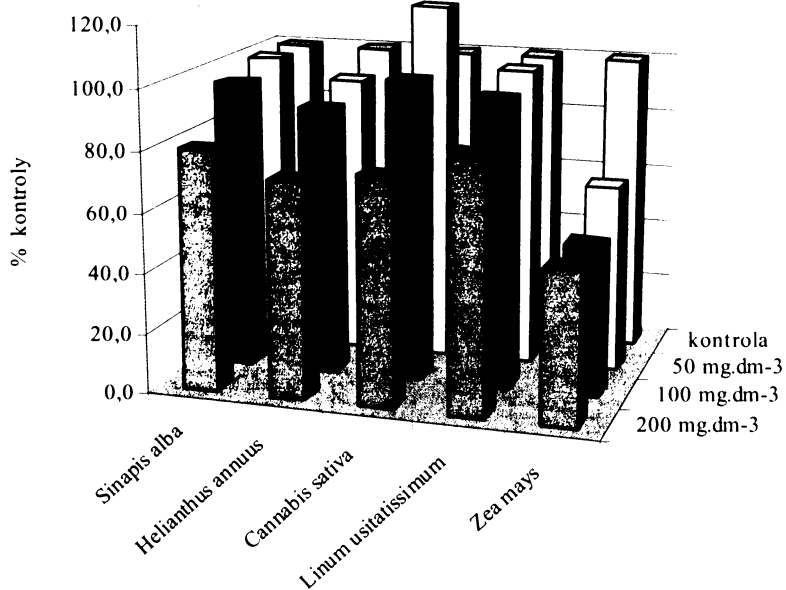
V dalším experimentu byla koncentrace nitrosloučenin opět snížena naředěním půdy zahradním substrátem (1:4). Tato koncentrace (TNT 0,0969 mg.g⁻¹, DNT 0,252 mg.g⁻¹) byla již pro rostliny toxická méně. Klíčivost oproti kontrole byla snížena pouze u hořčice a konopí. Fytotoxický účinek TNT byl pozorován na inhibici růstu semenáčků zejména u lnu a slunečnice. Přítomnost DNT naopak vedla k většímu nárůstu biomasy u slunečnice, lnu a hořčice (Tab.17.). Pokus byl po 3 měsících ukončen. V tabulce je porovnána čerstvá hmotnost jednotlivých druhů rostlin po ukončení pokusu. Semena kukuřice použítá v 2.a 3. pokusu vykazovala velmi nízkou klíčivost i u kontrolní skupiny.

Tab.17. Porovnání čerstvé hmotnosti rostlin sklizených po kultivaci na půdě kontaminované TNT, DNT.

	kontrola	DNT 0,252mg	TNT 0,0969mg
slunečnice	25,20g	58,00g	29,23g
kukuřice A	25,15g	38,45g	21,57g
len	23,78g	30,53g	8,57g
hořčice	21,48g	29,14g	16,17g

1.1.2. Vliv DNT na klíčení kulturních plodin v laboratorních podmínkách

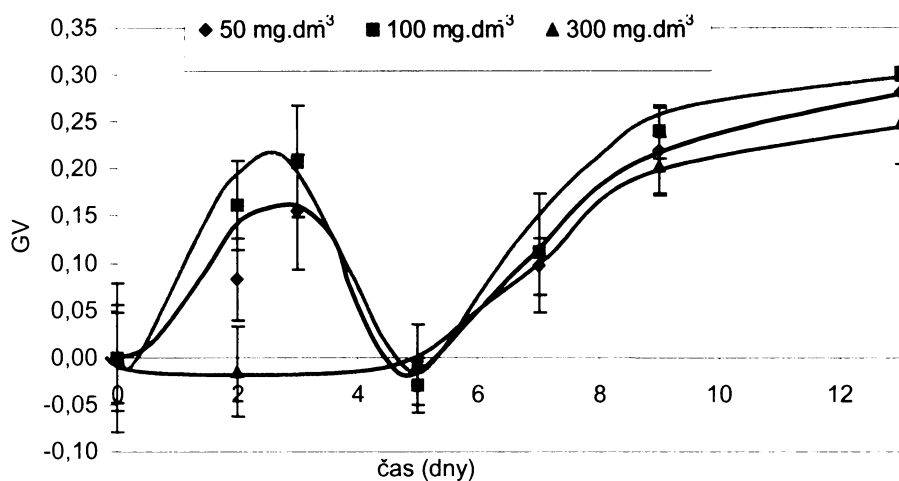
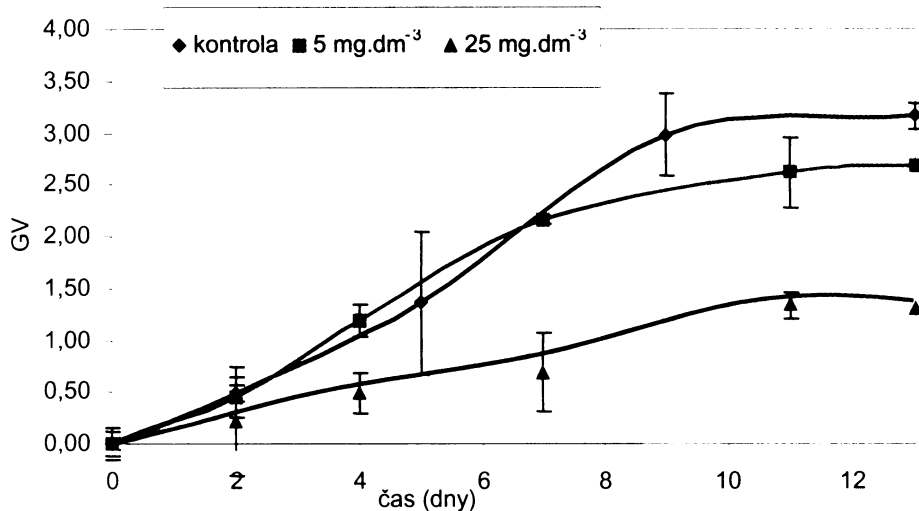
Vliv přítomnosti DNT v koncentraci (0-200 mg.dm⁻³) na klíčivost semen kulturních plodin byl testován také v laboratorních podmínkách. Semena (3 x 25 od každé varianty) klíčila 3 dny v petriho miskách na kultivačním mediu obohaceném DNT v koncentracích 50, 100, 200 mg.dm⁻³. Po uplynutí této doby byla klíčivost zhodnocena porovnáním s kontrolní skupinou. Více jak 20 % inhibice klíčivosti byla pozorována u většiny sledovaných druhů až při koncentraci 200 mg.dm⁻³, pouze u kukuřice byl pozorován toxický efekt již při koncentraci 50 mg.dm⁻³, naproti tomu stejná koncentrace DNT zvýšila klíčivost u konopí (Graf 1.).



Graf 1. Klíčivost semen kulturních plodin na mediu obohaceném DNT v různých koncentracích.

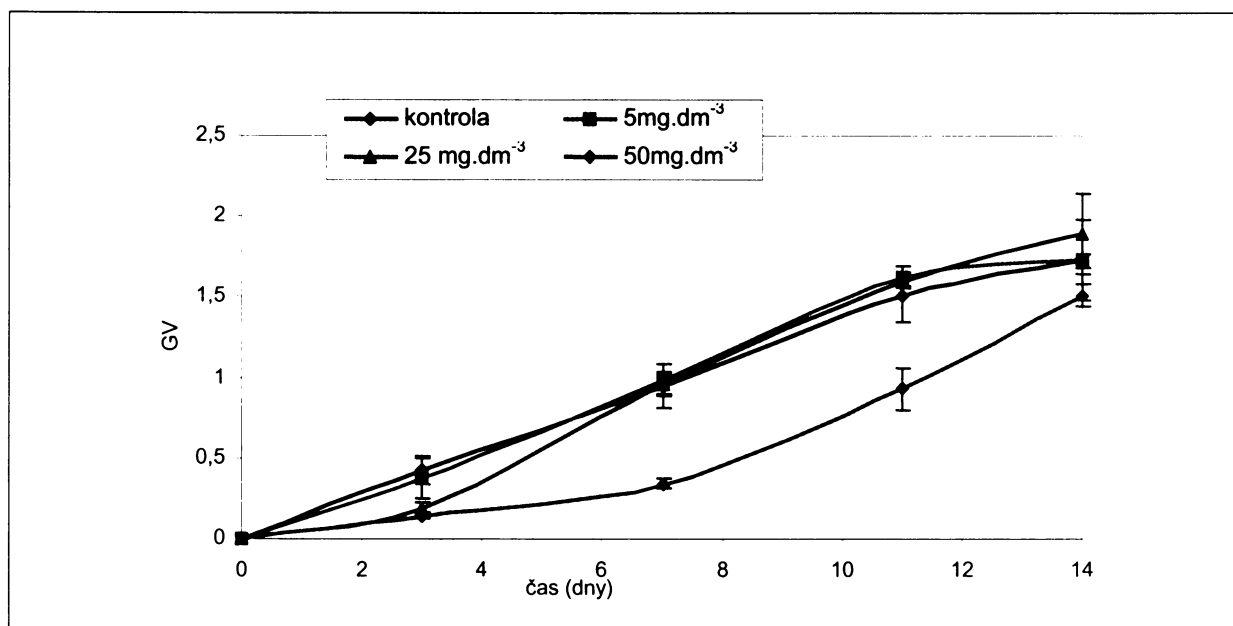
1.1.3. Vliv různých koncentrací TNT na růst suspenzních kultur topolu černého a mydlice lékařské

Vliv přítomnosti TNT na růst suspenzní buněčné kultury byl sledován na kultuře *Populus tremula* v rozmezí 12 dnů. Byly použity koncentrace TNT 5, 25, 50, 100 a 300 mg.dm⁻³, hodnoty byly vypočteny z 5 paralelních linií. TNT je špatně rozpustné ve vodě, a proto bylo před přidáním do media rozpuštěno v DMSO (1mg.cm⁻³). Výrazné snížení nárůstu biomasy bylo možné pozorovat u všech koncentrací vyšších než 25 mg.dm⁻³. U koncentrací 50 a 100 mg.dm⁻³ byl nárůst po třech dnech silně snížen, ale po odeznění toxických účinků došlo k opětovnému růstu kultury. V případě použití koncentrace 300 mg.dm⁻³ byl nárůst zastaven, došlo k odumření části kultury, po 5 dnech byl zaznamenán opět přírůstek biomasy, ovšem obdobně jako u kultur kultivovaných na mediu s přídatkem TNT v koncentraci 50 a 100 mg.dm⁻³ byl nárůst po 12 dnech ve srovnání s kontrolou 10x nižší (Graf 2.).



Graf 2. Porovnání růstových vlastností suspenzní kultury topolu černého na mediu s různou koncentrací TNT.

Dalším studovaným materiálem, na kterém byla obdobně testována citlivost k TNT, byla suspenzní kultura *Saponaria officinalis* odvozená ze semen rostliny nalezené v místě kontaminace touto látkou. Podle našich předpokladů byla vůči toxickému vlivu TNT odolnější. I když v počátečním stadiu kultivace byl při použití koncentrací TNT 25 a 50 mg.dm⁻³ růstový faktor nižší, u koncentrace 25 mg.dm⁻³ po 14 dnech kultivace byl nárůst srovnatelný s kontrolou, u koncentrace 50 mg.dm⁻³ došlo k pouze 10 % snížení nárůstu biomasy (Graf 3)..



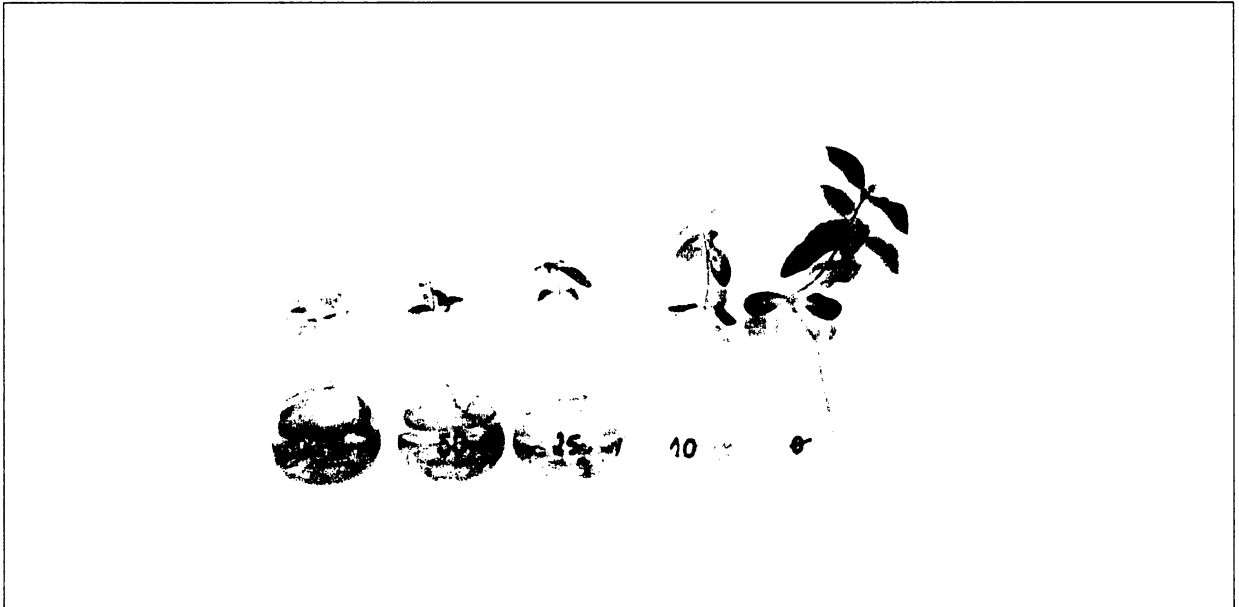
Graf 3. Porovnání růstových vlastností suspenzní kultury mydlice lékařské na mediu s různou koncentrací TNT.

1.2. DEGRADAČNÍ STUDIE

1.2.1. Degradace TNT hydroponicky pěstovanými slunečnicemi

Na hydroponicky pěstovaných rostlinách *Helianthus annuus* L. byl testován vliv iniciační koncentrace na jejich růst, na rychlost degradace TNT a výskyt degradačních produktů. K experimentům byly použity 14 denní semenáčky, pro každou koncentraci 5 rostlinek + kontrola s DMSO ($0,1 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ media), ve kterém bylo rozpuštěno TNT. Pro TNT byla zvolena koncentrační řada 0, 10, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Růst semenáčků slunečnic byl koncentrací TNT silně ovlivněn, již při koncentraci 10 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl růst pozastaven, na listech začínaly být patrné známky usychání, medium se mírně zbarvovalo do červena přítomností fenolických látek vylučovaných rostlinou v důsledku stresu (Obr. 30.). Při aplikaci 100 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ rostliny uschly, jejich medium bylo silně zbarveno do červena. Silně zbarveny byly i kořeny. Barevné látky v mediu byly zakoncentrovány pomocí kolony se sorbentem Si-C¹⁸ a rozděleny pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Jednotlivé barevné

frakce byly podrobeny analýze na LC-MS, kde jejich hmotností spektra odpovídala látkám s vyšším obsahem aromatických jader. Infračervená spektra potvrdila formaci aminoproduktů a oxidaci na metylové skupině. Analýza pomocí magnetické rezonance našla u frakcí 11 a 12 cukerné zbytky (Obr. 31.).

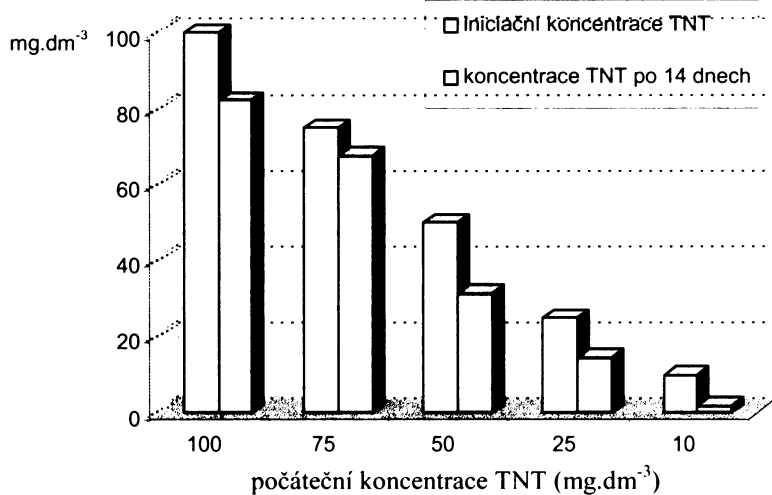


Obr. 30. Vliv koncentrace TNT (100, 50, 25, 10 mg.dm⁻³) v mediu na růst hydroponicky kultivovaných slunečnic ročních.(13.den kultivace)

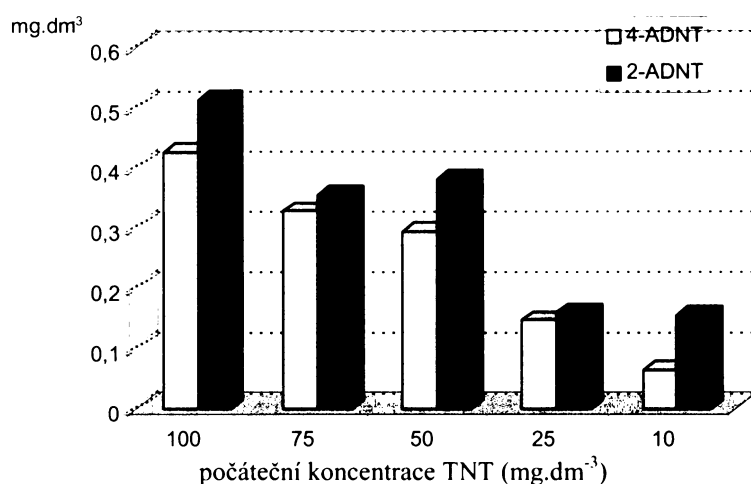
	#	+/- APCI	IR - function groups	NMR
	1	227	=C-H, C-H, arom., -CH ₃	
1	2	757.8	NH ₂ , C-N, -NO ₂ , -COO ⁻ , -CH ₃	
2	3	681.5	C-H, -NO ₂	
3	4	844.3	C-H, -NO ₂ , -CH ₃	
4	5	844.3	C-H, -NO ₂ , -CH ₃	
5	6	662.3	C-H, -NO ₂ , -CH ₃	
6	7	359	C-H, -NO ₂	
7	8	583.3	C-H, -NO ₂ , -CH ₃	
8	9	883	C-H, -NO ₂ , -OH, C-O, -CH ₃	
9	10	525	C-H, -NO ₂ , -CH ₃	
10	11	684		Glycosylováno
11	12	431	C-H, -NO ₂ , -OH, C-O	Glycosylováno

Obr.31. Preparativní TLC koncentrovaného vzorku media po kultivaci slunečnic ročních s TNT a výsledky analýzy jednotlivých frakcí.

Degradační schopnost rostlin slunečnice byla závislá na počáteční koncentraci TNT v mediu (*Graf 4.*). Při aplikaci 10 mg na 1 dm³ media, ubylo z media po 14 dnech kultivace rostlin 81,3 % TNT, 1,5 % bylo přeměněno na 2-amino-4,6-dinitrotoluen (2-ADNT) a 0,6 % na 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4-ADNT), naproti tomu při koncentraci 100 mg.dm⁻³ ubylo z media pouze 17 % aplikovaného TNT, které se pouze z 0,5 % resp. 0,4 % redukovalo na 2-ADNT resp. 4-ADNT (*Graf 5.*). Analýza obsahu TNT a 4-ADNT jako majoritního produktu degradacev rostlinkách ukázala nejvyšší degradační aktivitu v kořenech (*Tab.18.*)



Graf 4. Degradace TNT hydroponickou kulturou slunečnic ročních v závislosti na jeho počáteční koncentraci.



Graf 5. Množství degradačních produktů, vzniklých po 14 denní kultivaci slunečnic ročních na mediu obohaceném TNT v různých koncentracích.

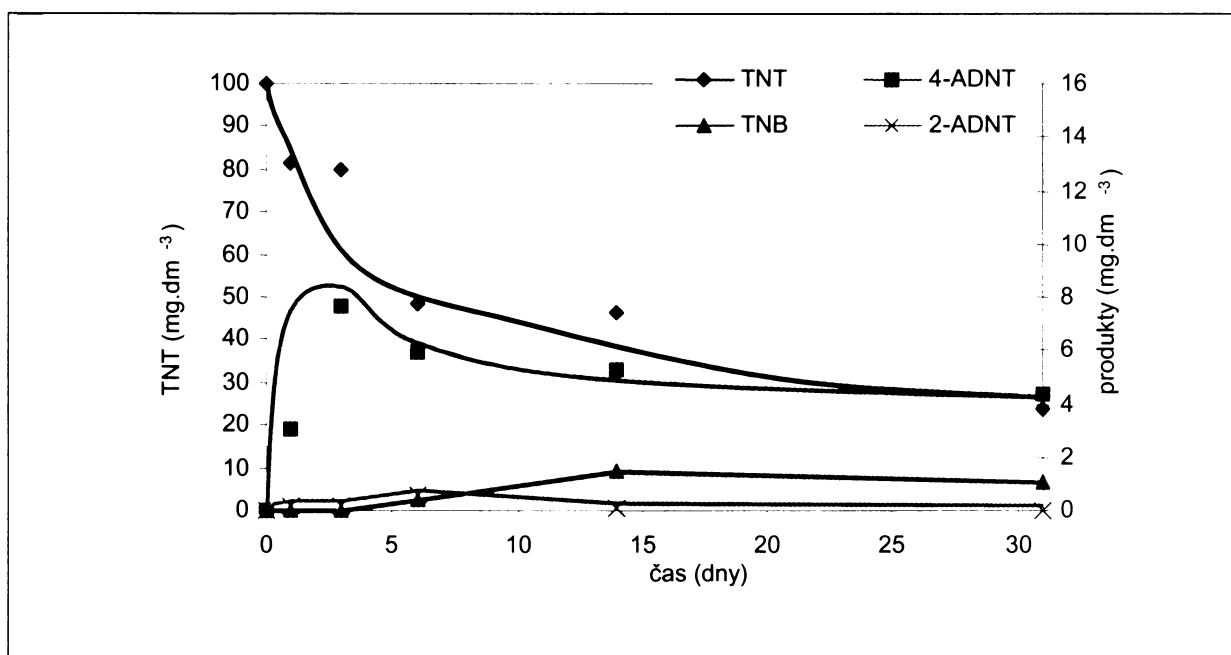
Tab. 18. Obsah TNT (mg.g⁻¹ DM) a produktu degradace 4-ADNT (mg.g⁻¹ DM) v jednotlivých částech rostlin, nd= množství nedetekovatelné na HPLC.

	TNT	4-ADNT
listy	nd	0,12
stonek	1,96	0,72
kořeny	nd	1,26

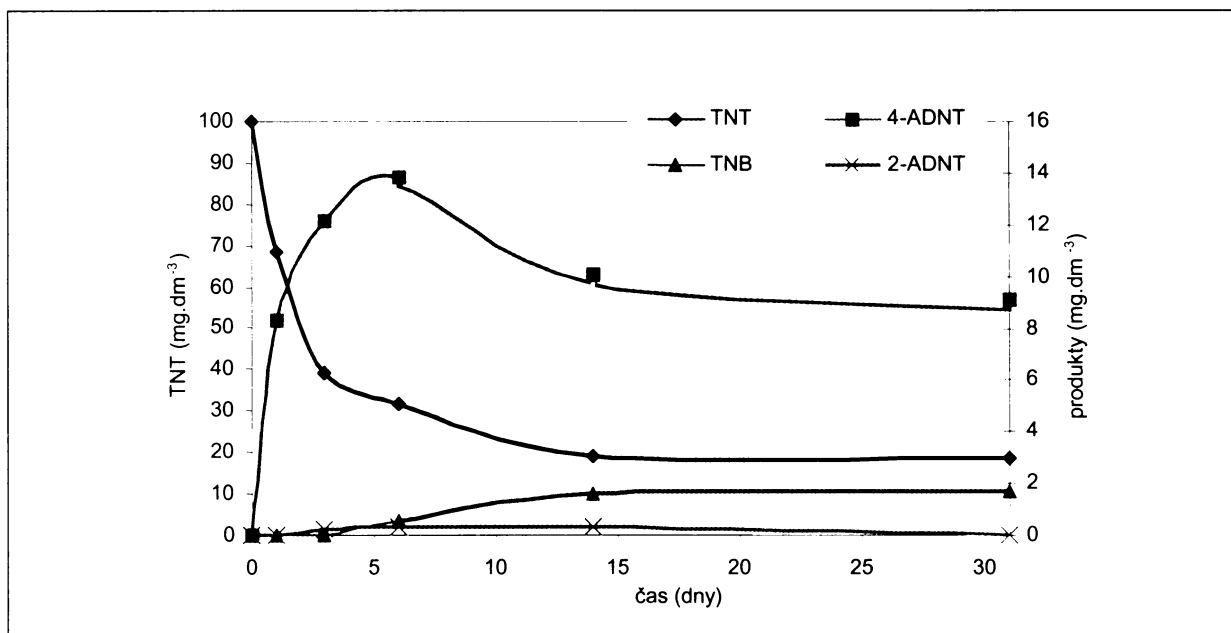
1.2.2. Degradace TNT in vitro kulturou regenerantů hybridu topol osika a topolu černého

Schopnost degradace nitrosloúčenin u hydroponicky kultivovaných rostlin byla dána součinností rostlinného metabolismu s mikrobiálním. Ke sledování čistě rostlinného metabolismu bylo nutné použít sterilně pěstované kultury. Byli použity *in vitro* kultury

regenerantů topolu černého a hybridu topol osika, protože rod *Populus* je v literatuře uváděn jako druh velmi vhodný pro využití fytořediační techniky. Rostliny byly pěstovány 31 dní na mediu obohaceném TNT v koncentraci 100 mg.dm^{-3} . Obsah TNT v mediu klesl u všech kultur, rychleji u kultur topolu, v mediu byly detekovány produkty jeho degradace. Nejvíce bylo nalezeno 4-ADNT, jeho množství prudce stoupl během první 3-5 dní, kdy dosáhlo maxima, v případě topolových kultur $13,82 \text{ mg.dm}^{-3}$, u kultur hybridu jen $7,71 \text{ mg.dm}^{-3}$. Dále bylo detekováno velmi malé množství 2-ADNT a trinitrobenzen (TNB) (Graf 6. a 7.).



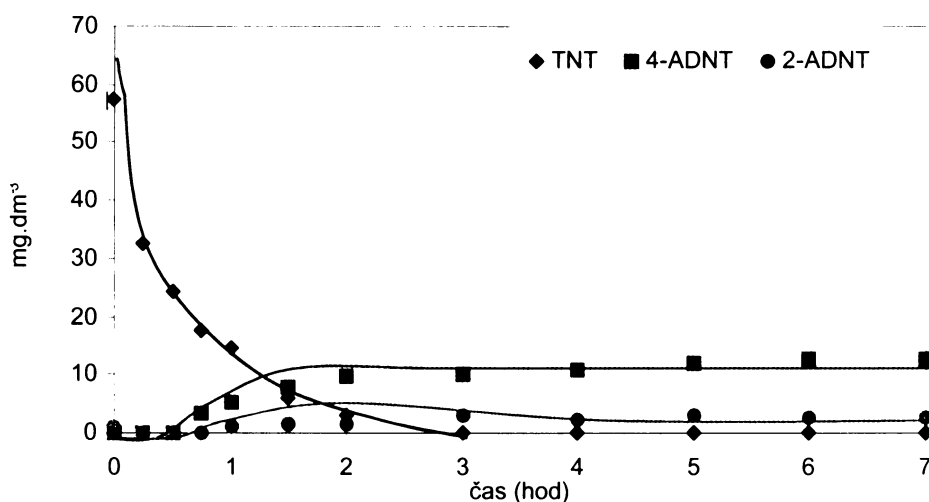
Graf 6. Degradace TNT in vitro kulturou regenerantů hybridu topol osika. Obsah TNT a jeho degradačních produktů v kultivačním mediu.



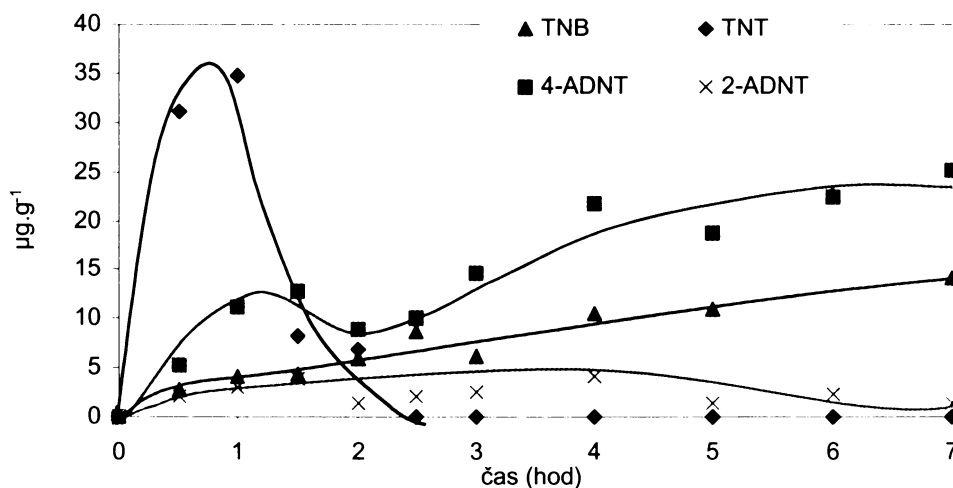
Graf 7. Degradace TNT in vitro kulturou regenerantů topolu černého. Obsah TNT a jeho degradačních produktů v kultivačním mediu.

1.2.3. Degradace TNT suspenzí kulturou mydlice lékařské

Pro podrobnější pohled na degradaci nitrolátek rostlinným metabolismem byla vybrána suspenzní kultura mydlice, která vykazovala proti toxickým účinkům TNT vysokou odolnost. K pokusu byly použity kultury staré 10 dní, k inokulaci bylo použito 10g FM buněk, v době pokusu se FM pohybovala v rozmezí 17,35 - 25,61 g. Iniciační koncentrace TNT byla 60 mg.dm⁻³. Degradace TNT suspenzní kulturou mydlice probíhala velmi rychle. Po 3 hodinách bylo množství TNT v mediu pod hranicí detekovatelnosti, a již v průběhu první hodiny bylo možné identifikovat redukční produkty – aminodinitrotolueny, a to jak v acetonovém extraktu z buněk, tak v mediu. Na grafu je velmi dobře patrná absorpce TNT do buněk a jeho následná degradace. V rostlinném extraktu mydlice byl identifikován i meziprodukt oxidace TNT trinitrobenzen (Graf 8. a 9.).



Graf 8. Degradace TNT suspenzí kulturou mydlíce lékařské. Obsah TNT a jeho degradačních produktů v kultivačním mediu.

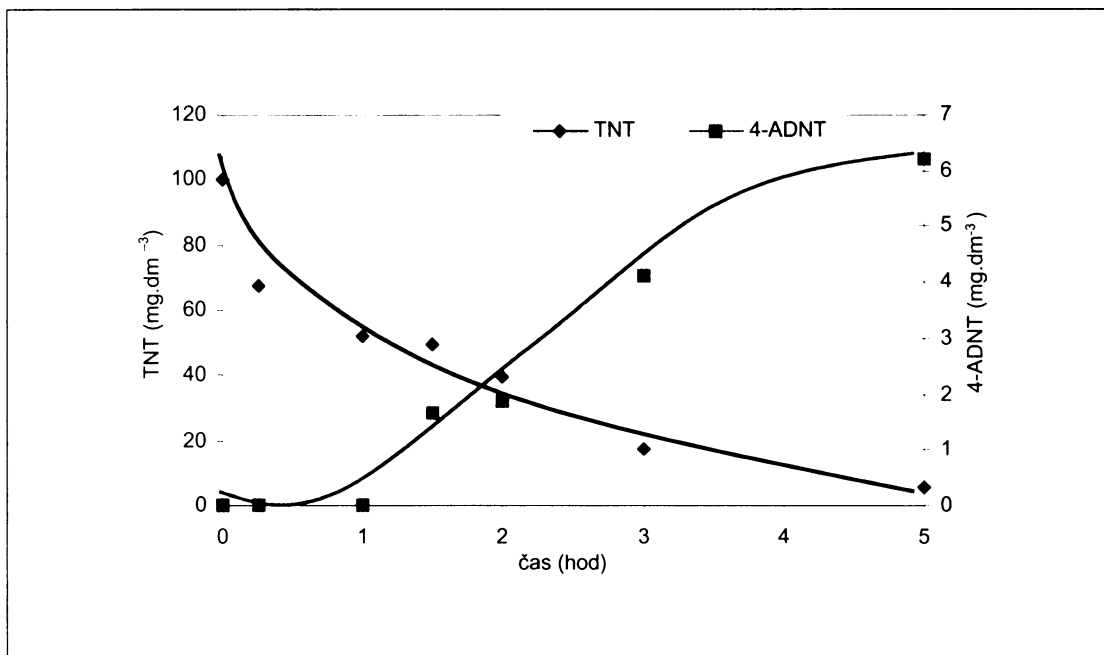


Graf 9. Degradace TNT suspenzí kulturou mydlíce lékařské. Obsah TNT a jeho degradačních produktů v buňkách (vztaženo na 1g čerstvé hmotnosti)

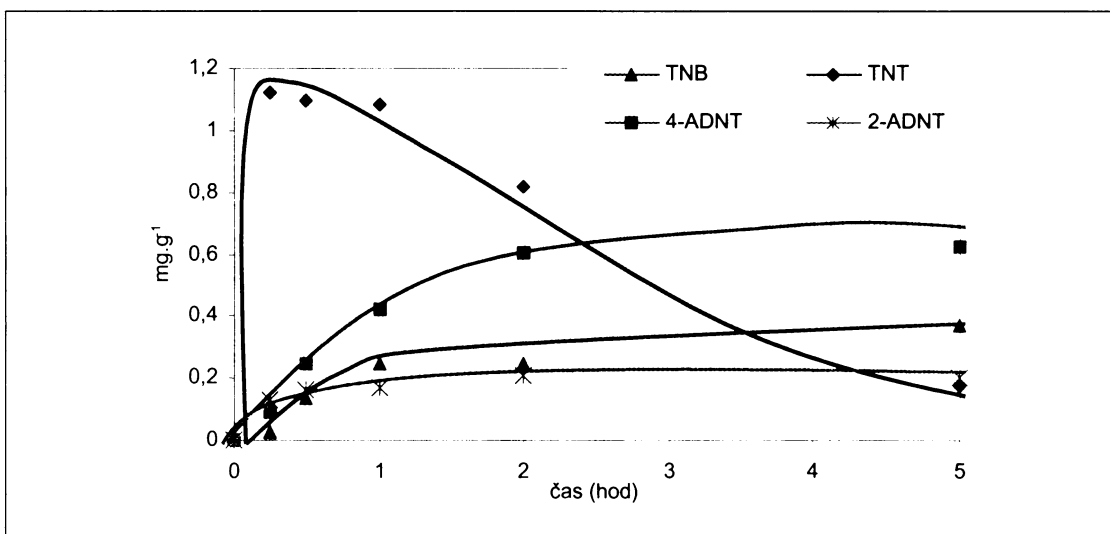
1.2.4. Degradace TNT suspenzí kulturou konopí setého

Schopnost rostlinných buněk odbourávat TNT byla dále ověřena na suspenzí kultuře konopí setého. Pokusné kultury byly inokulovány 10 g buněk do 50 cm³ kultivačního media. Po 3 dnech byl kulturám aplikován TNT (100 mg.dm⁻³) rozpuštěný v DMSO, vzorky byly odebírány během první hodiny každých 15 minut a dále pak každou hodinu. Po 5

hodinách se koncentrace TNT v mediu snížila na pouhých $5,4 \text{ mg.dm}^{-3}$, již po 1 hodině bylo možné v mediu detekovat 4-ADNT, jeho množství se zvýšilo po 5 hodinách až na 6 mg.dm^{-3} (Graf 10.). Acetonový extrakt z buněk obsahoval nejvíce TNT po 15 minutách od iniciace, od 1. hodiny jeho obsah klesal až na hranici detekovatelnosti, souběžně s poklesem TNT se v extraktu objevily produkty 4-ADNT, 2-ADNT, vzniklé redukcí NO_3 skupiny a TNB pocházející z oxidační cesty metabolismu TNT (Graf 11.).



Graf 10. Degradace TNT suspenzí kulturou konopí setého, obsah TNT a degradačních produktů v mediu



Graf 11. Degradace TNT suspenzí kulturou konopí setého, obsah TNT a degradačních produktů v buněčném extraktu (vztaženo na 1g sušiny)

1.2.5. Metabolismus produktů degradace TNT.

U nitrosloučenin, které byly identifikované v médiu či v buněčném extraktu během degradace TNT bylo sledováno, zda se jedná o konečné produkty či meziprodukty degradačního procesu, a to jak při použití suspenzní kultury (mydlice, len), tak hydroponie (slunečnice) (Tab. 19.). Při degradaci aminodinitrotoluenů a diaminonitrotoluenů nebyly v médiu testovaných kultur identifikovány žádné další produkty. Degradace TNB probíhala velmi rychle, a to i v hydroponickém systému. Při degradaci TNB suspenzní kulturou mydlice byl v médiu identifikován jako meziprodukt dinitroanilin (DNA) (Graf 12.).

Tab.19. Odbourávání jednotlivých produktů, identifikovaných v médiu a buňkách v průběhu degradace TNT, různými rostlinnými kulturami (v mg.dm⁻³). Obsah látek v médiu.

mydlic

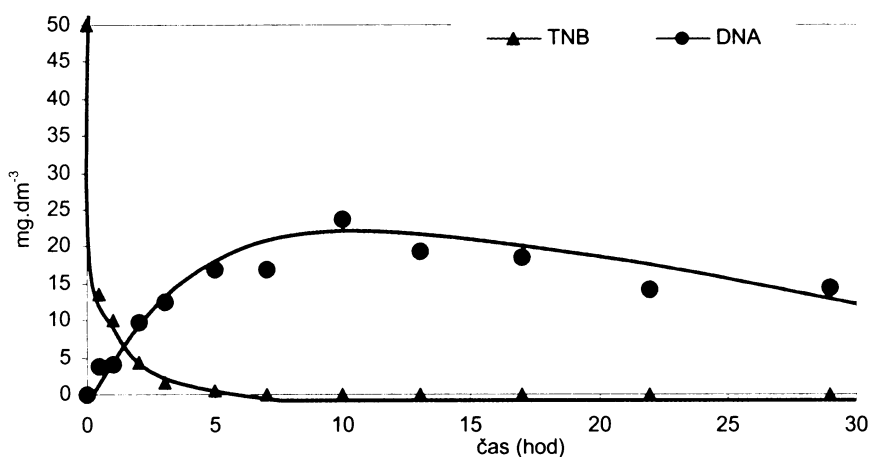
	2,6-DANT	2,4-DANT	4-ADNT	TNB	DNA
0	100	100	100	100	100
1hod	80.1	69.8	18.8	20.2	85.3
6 hod	28.0	23.6	15.6	0	33.0
24 hod	5.0	3.0	12.5	0	27.2

len

	2,4-DANT	2,6-DANT	4-ADNT
0	100	100	100
1hod	4.02	5.01	17.5
4 hod	2.08	3.68	1.01
12 hod	1.20	3.85	0

slunečnic

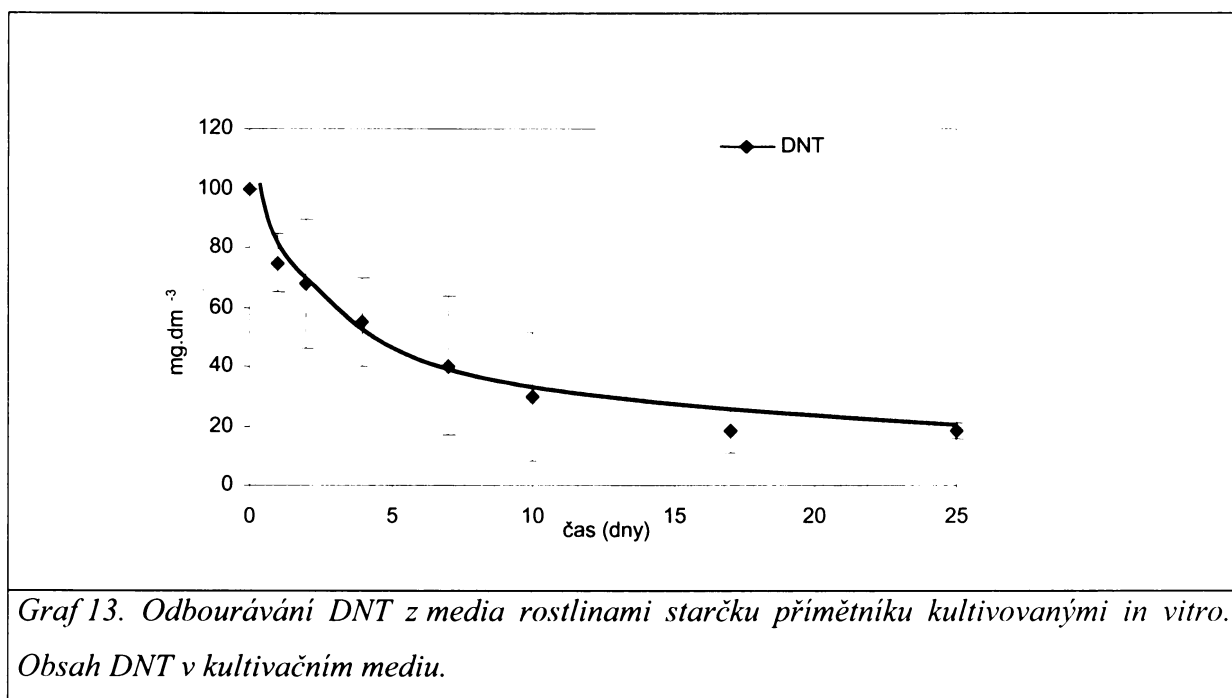
	TNB	ADNT	2,6DANT	2,4DANT
0	100	100	100	100
5 hod	50.8	38.6	105.5	97.0
13 hod	0.00	23.7	97.3	68.3



Graf 12. Degradace TNB suspenzí kulturou mydlice lékařské. Obsah TNB a jeho degradačního produktu DNA v kultivačním mediu.

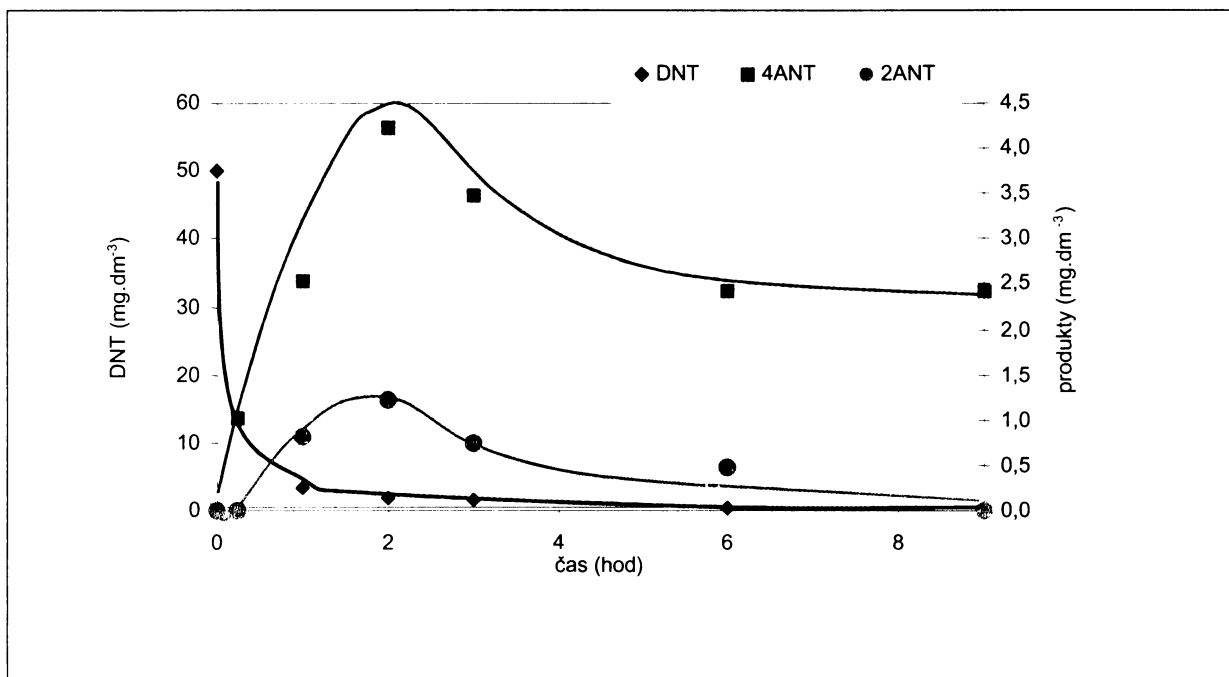
1.2.6. Degradace DNT in vitro kulturou regenerantů starčku přímětníku

Ačkoliv schopnost degradace TNT byla popsána u mnoha rostlinných druhů, průběh degradace 2,4-dinitrotoluenu (DNT) byl sledován pouze u živočichů a mikroorganismů, přestože se jedná o velmi důležité xenobiotikum, často doprovázející kontaminace TNT v nezanedbatelné koncentraci. Ve srovnání s TNT je ve vodě mnohem rozpustnější, což vede ke zvýšení jeho toxicity pro všechny organismy. Schopnost rostlin degradovat DNT byla ověřena na *in vitro* kulturách regenerantů starčku. K experimentům byly použity kultury 20 dní po poslední pasáži. Poměrně vysoká počáteční koncentrace 100 mg.dm^{-3} DNT nebyla pro rostlinky letální. Po 25 dnech bylo odstraněno 80 % DNT z kultivačního media. Vysoké rozdíly v naměřených hodnotách jsou dány poměrně širokým rozpětím velikosti rostlin (Graf 13.).

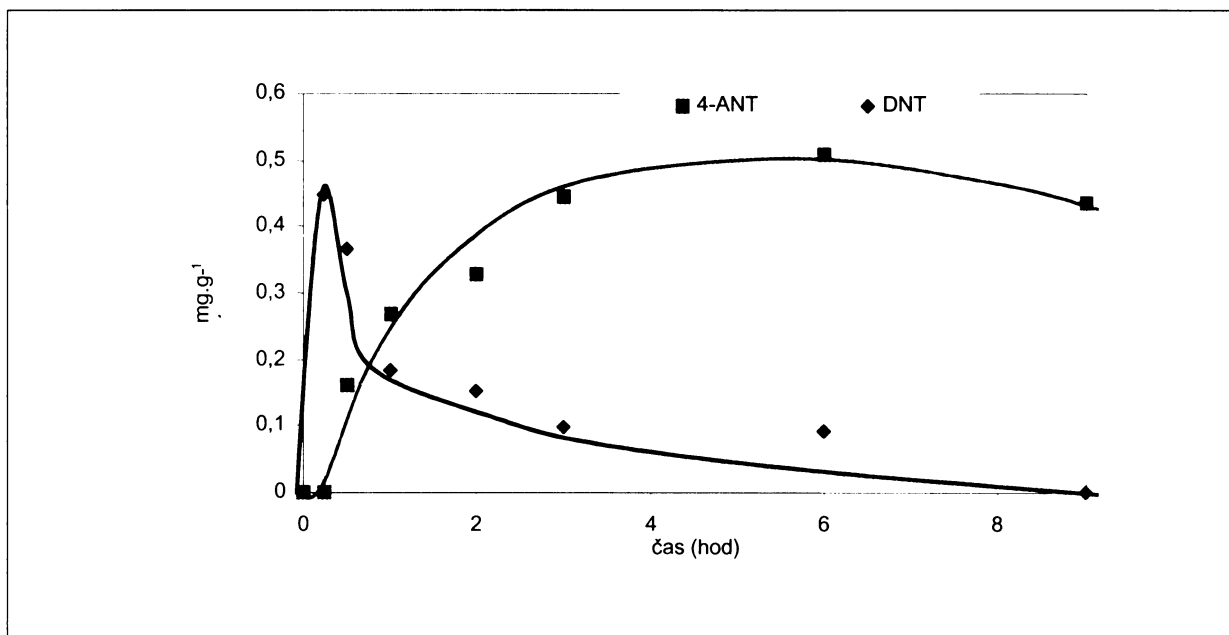


1.2.7. Degradace DNT suspenzní kulturou mydlice lékařské.

K nalezení degradačních produktů byla použita suspenzní kultura mydlice lékařské kultivovaná 15 dní. Snížení počáteční koncentrace DNT (50 mg.dm^{-3}) z media proběhlo velmi rychle, již po 1 hodině obsahovalo medium pouze 10 % původního množství sloučeniny. V mediu byly identifikovány dva degradační produkty : 4-aminonitrotoluen (4-ANT) a 2-aminonitrotoluen (2-ANT). 4-ANT bylo v mediu 4x více než 2-ANT (Graf 14.). Analýza buněčného extraktu ukázala, že stejně jako v případě TNT je DNT absorbováno do buněk, v nichž probíhá dále redukce na aminosloučeniny. V buněčném extraktu byl identifikován DNT, jehož množství prudce stoupalo během 1. hodiny a dále postupně klesalo. Dále byl identifikován 4-ANT, jehož množství se zvyšovalo až do 6. dne (Graf 15.).



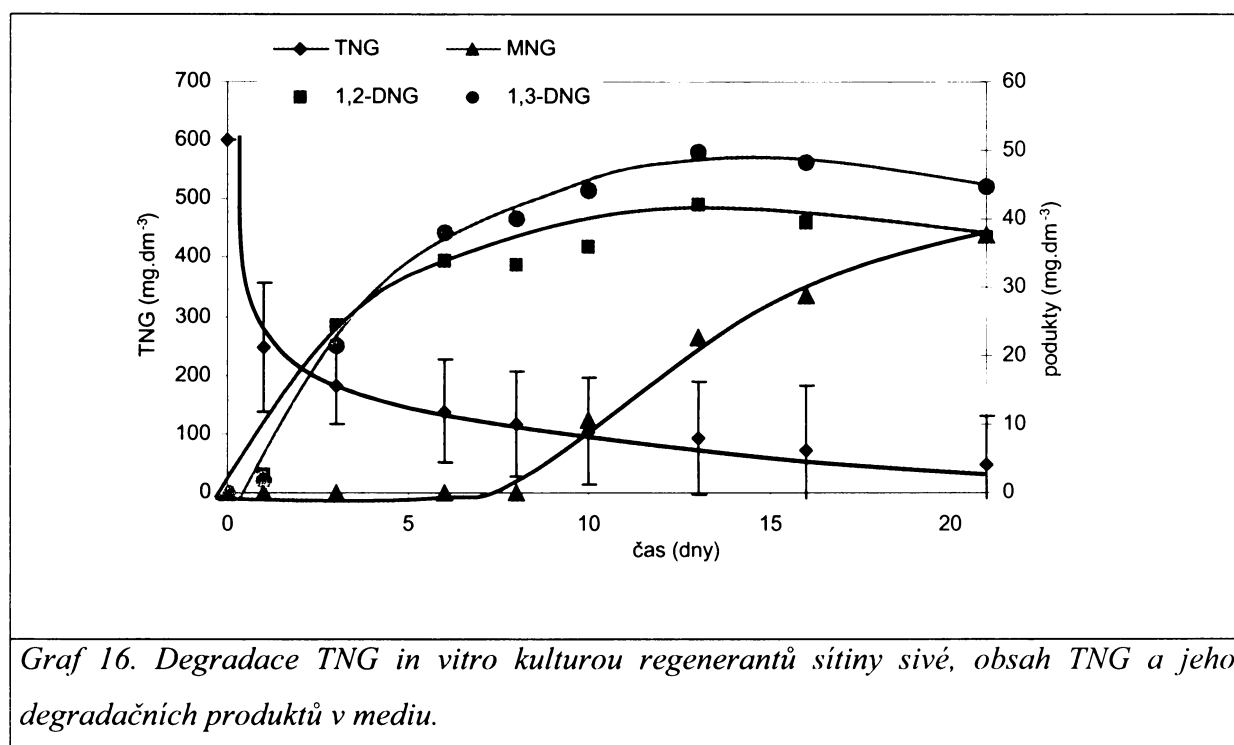
Graf 14. Degradace DNT suspenzí kulturou mydlíce. Obsah DNT a jeho degradačních produktů v mediu.

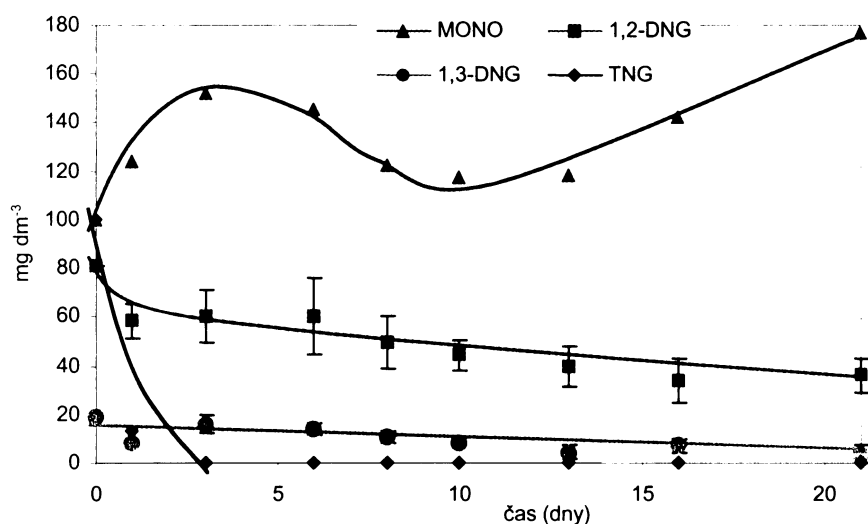


Graf 15. Degradace DNT suspenzí kulturou mydlíce. Obsah DNT a jeho degradačních produktů v acetonovém extraktu z buněk (vztaheno na 1g sušiny).

1.2.8. Degradace TNG in vitro kulturou regenerantů sítěny.

Rostliny sítěny pěstované v kultivačních boxech na MS mediu bez přidavku regulátorů růstu byly vystaveny účinku trinitrolycerinu (TNG) v koncentraci 600 mg.dm^{-3} . Již po 24 hodinách bylo odbouráno více než 50 % původního množství TNG a v mediu bylo detekováno malé množství degradačních produktů – dinitrolycerinů (DNG). Od šestého dne medium obsahovalo větší množství 1,3-DNG než 1,2-DNG. Další meziprodukt odbourávání mononitrolycerin (MNG) byl detekován až po 10 dnech, jeho množství pak prudce stoupalo (Graf 16.). Velká odchylka v datech byla dána poměrně velkým rozptylem v hmotnosti použitých rostlin (2,24 g - 8,22 g FM). Při stejné počáteční koncentraci TNG, DNG a MNG (á 100 mg.dm^{-3}) bylo možné v mediu pozorovat měnící se množství MNG v závislosti na odbourávání TNG a částečně i DNG (Graf 17.).

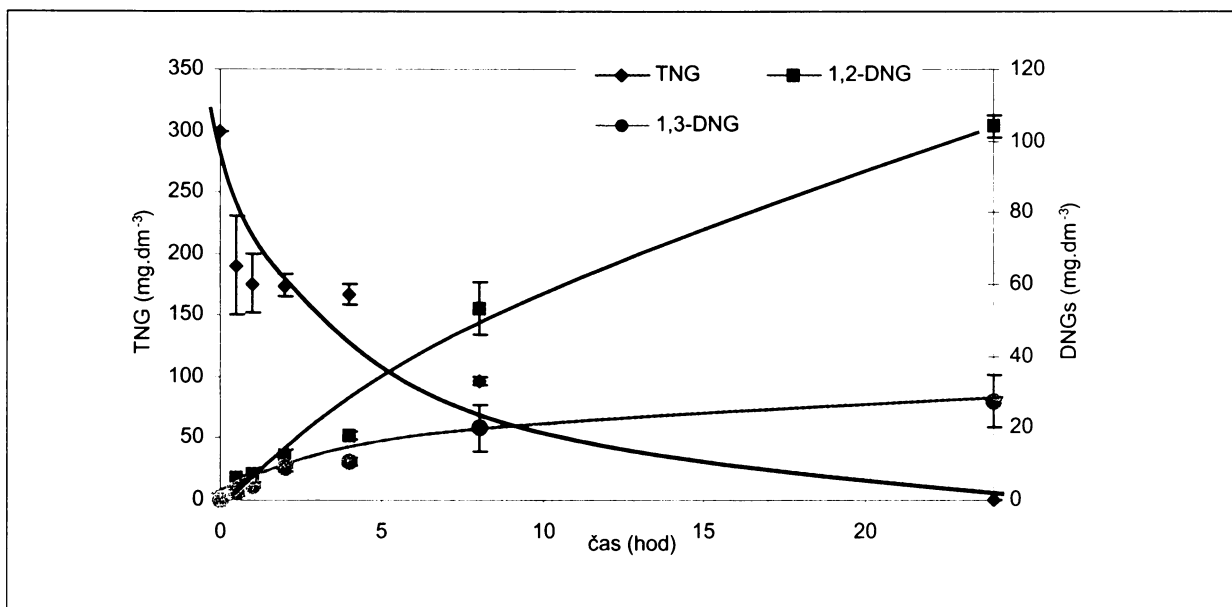




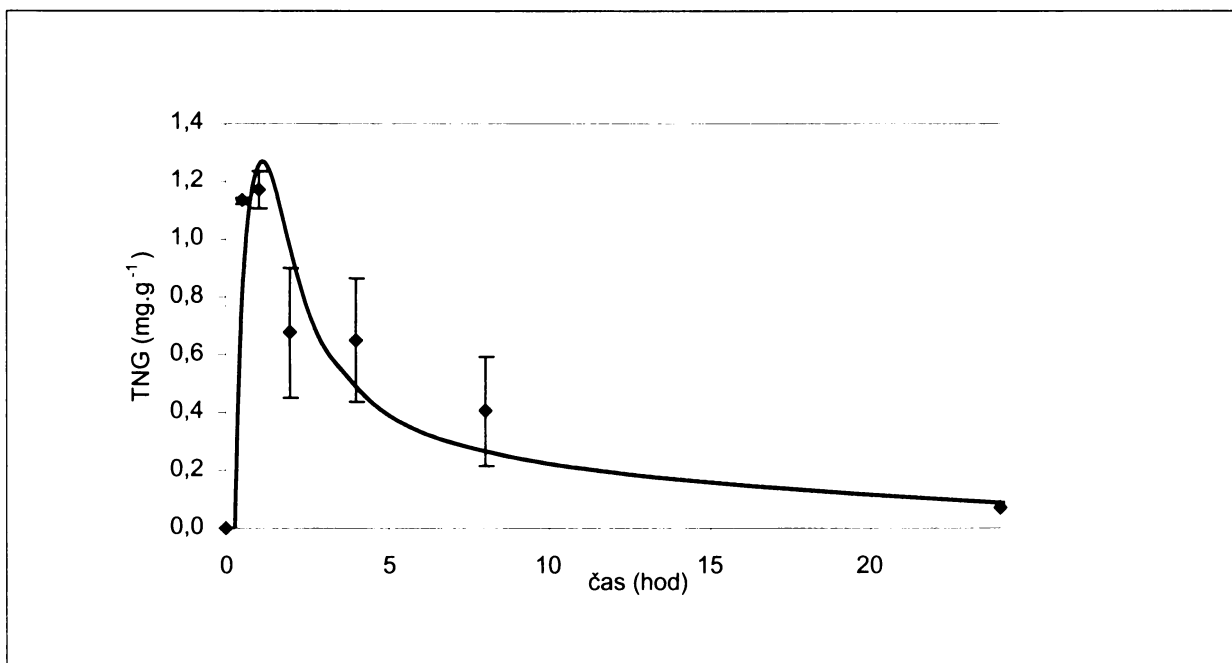
Graf 17. Degradace směsi nitroesterů *in vitro* kulturou regenerantů sítěny sivé. Obsah látek v kultivačním mediu.

1.2.9. Degradace TNG suspenzí kulturou lnu.

V tomto experimentu byly použity suspenzní kultury lnu staré 10 dní, které byly inokulovány 10 g buněk. Hodnoty byly získány ze tří paralelních odběrů. Kultury byly vystaveny TNG v počáteční koncentraci $300 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. V průběhu odbourávání TNG z media byly detekovány DNG jako meziproducty degradace. MNG – další předpokládaný meziproduct postupného odbourávání nitroskupin na glycerol nebyl detekován ani v mediu ani v acetonovém extraktu z buněk (Graf 18. a 19.).



Graf 18. Degradace TNG suspenzní kulturou *lnu setého*. Obsah TNG a jeho degradačních produktů v mediu.



Graf 19. Degradace TNG suspenzní kulturou *lnu setého*. Obsah TNG v buňkách.

4.1 TOXICITA NITROSLOUČENIN A JEJICH DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ

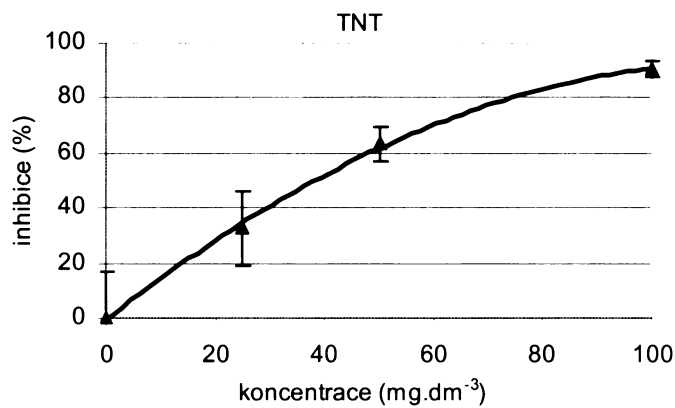
Fytotoxicita vybraných nitrosloučenin byla testována dle normy ISO 7346 jako inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin *Sinapis alba*. Výsledky sloužily jednak k porovnání toxicity mezi jednotlivými typy výbušnin (TNT, DNT, TNG) a zejména k porovnání toxicity výchozí sloučeniny a jejích degradačních produktů (HADNT, 2-ADNT, 4-ADNT, DANT, TNB, 2-ANT, 4-ANT, DAT, DNG).

Podle očekávání byla prokázána vyšší toxicita u nitroaromatických látek v porovnání s nitroestery, hodnoty IC_{50} pro nitroestery se pohybovaly v rozmezí 150-200 $mg \cdot dm^{-3}$, zatímco u aromatických látek v rozmezí 10-80 $mg \cdot dm^{-3}$.

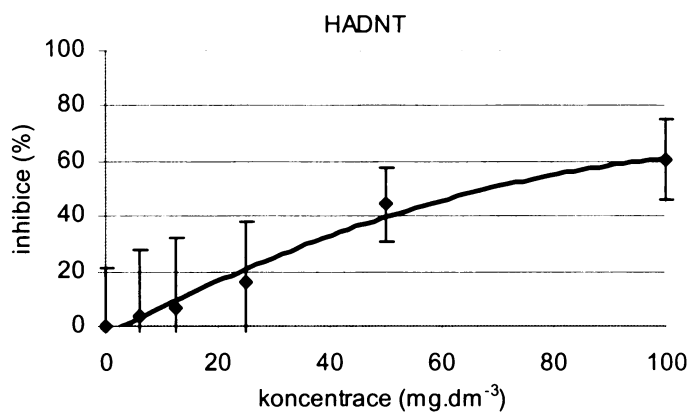
Degradační produkty TNT byly pro klíčící hořčice méně toxické než výchozí látka s výjimkou TNB, který prokázal vůbec nejvyšší fytotoxicitu ze sledovaných látek. Koncentrační řada byla zvolena 5-100 $mg \cdot dm^{-3}$, protože rozpustnost TNT a jeho degradačních produktů ve vodě se pohybuje kolem 100 $mg \cdot dm^{-3}$. V této koncentraci způsoboval 90 % inhibici jak TNT, tak TNB, toxicita ADNT a DANT byla nižší, inhibice růst primárního kořene se pohybovala v rozmezí 55-70 % (*Graf 20.-25.*).

DNT a jeho degradační produkty ANT působily o něco méně toxicky než TNT, při koncentraci 100 $mg \cdot dm^{-3}$ inhibovaly růst kořene přibližně z 80 %. Konečný produkt nitroredukce DAT vykazoval v porovnání s výchozí látkou velmi nízkou toxicitu, při koncentraci 100 $mg \cdot dm^{-3}$ vykazoval 40 % inhibici (*Graf 26.-29.*).

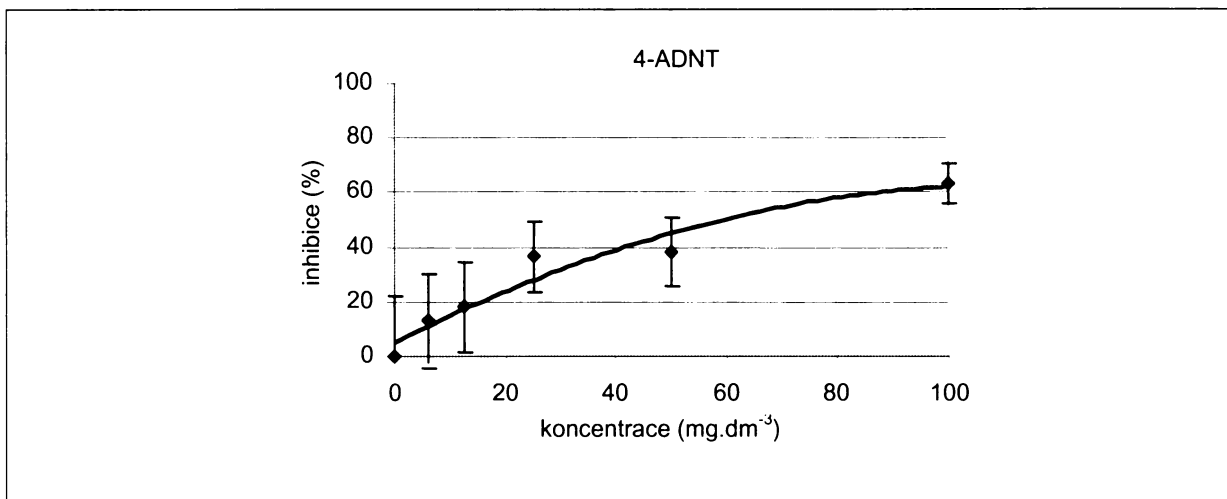
Protože jsme předpokládali u nitroesterů nižší fytotoxické účinky, navýšily jsme koncentrační řadu až na 400 $mg \cdot dm^{-3}$. Při takto vysoké koncentraci byla 100 % inhibice pozorována u TNG a DNG, zatímco MNT vykazoval inhibici nižší, pouze kolem 50 % (*Graf 30.-32.*).



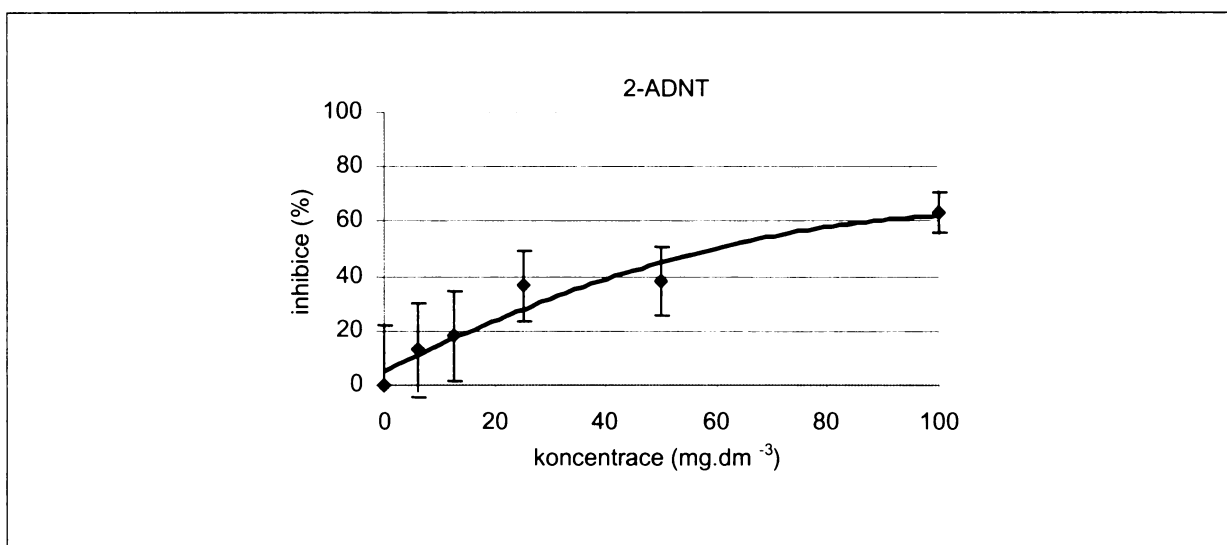
Graf 20. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci TNT v mediu.



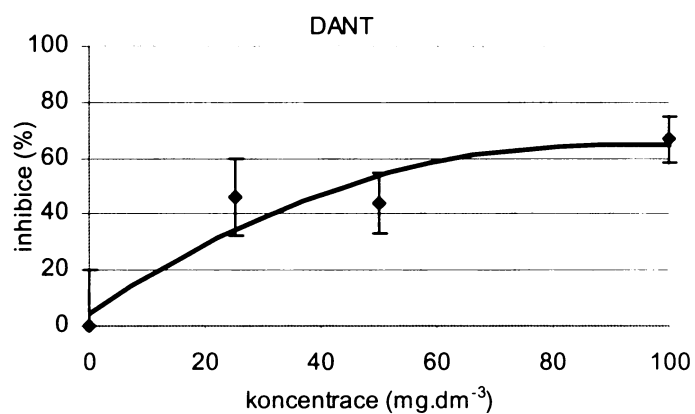
Graf 21. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci HADNT v mediu.



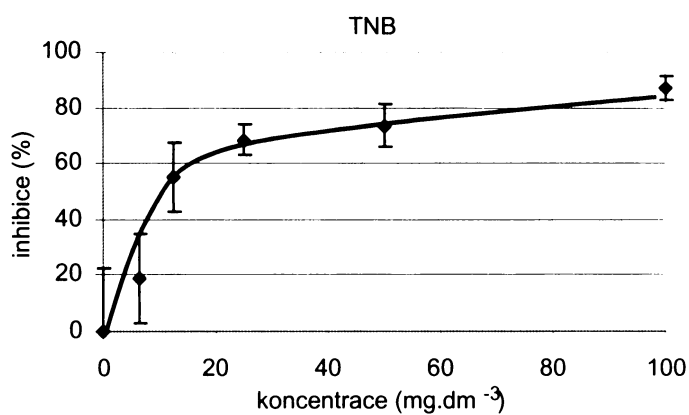
Graf 22. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci 4-ADNT v mediu.



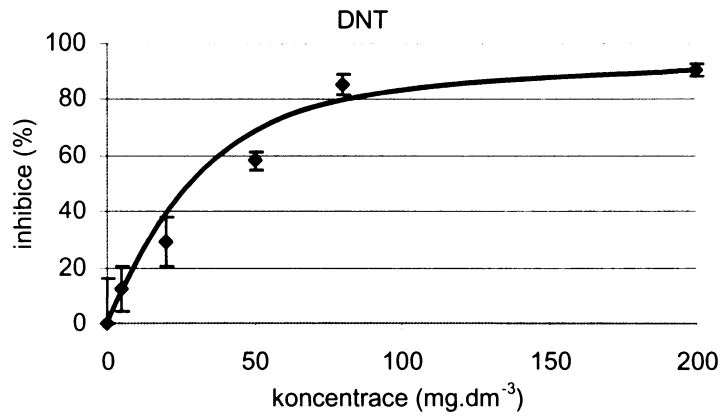
Graf 23. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci 2-ADNT v mediu.



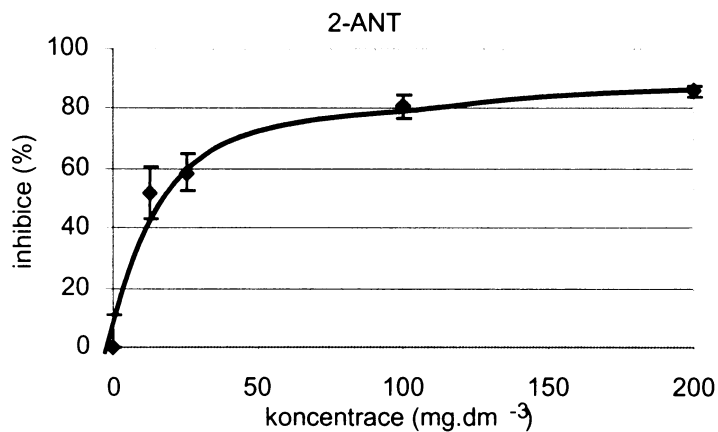
Graf 24. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci DANT v mediu.



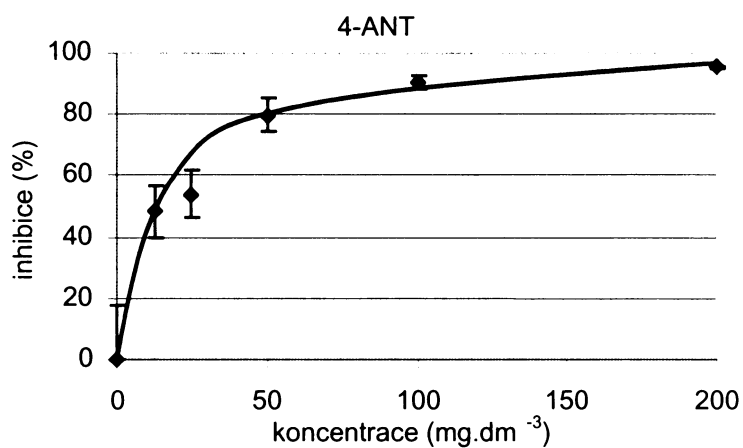
Graf 25. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci TNB v mediu.



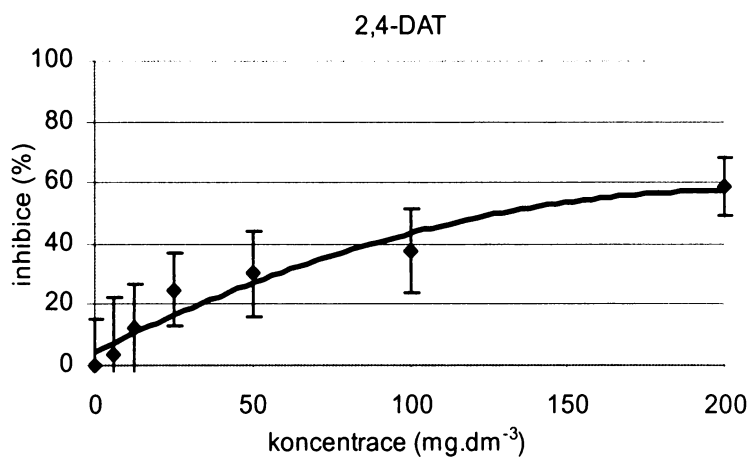
Graf 26. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci 2,4-DNT v mediu.



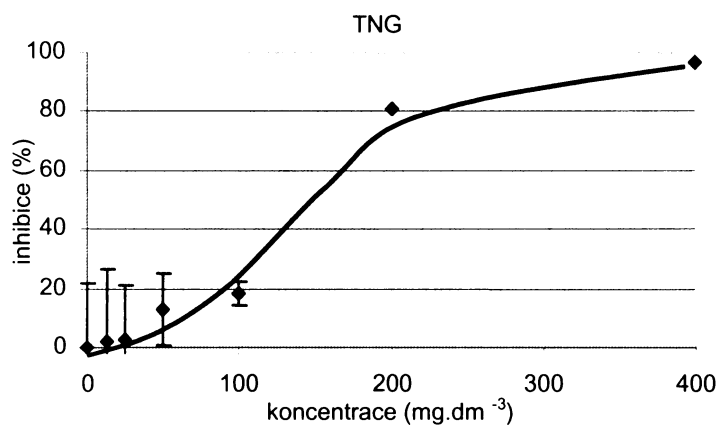
Graf 27. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci 2-ANT v mediu.



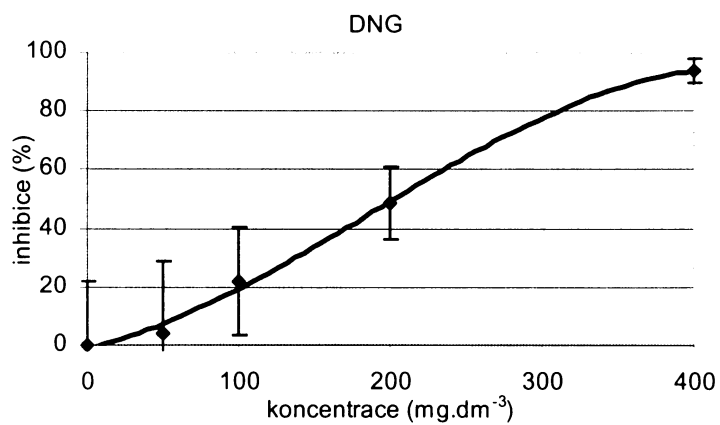
Graf 28. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci 4-ANT v mediu.



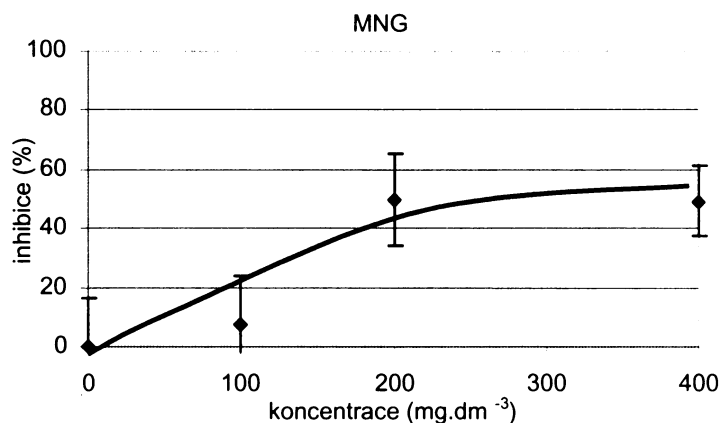
Graf 29. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci 2,4-DAT v mediu.



Graf 30. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci TNG v mediu.



Graf 31. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci DNG v mediu.

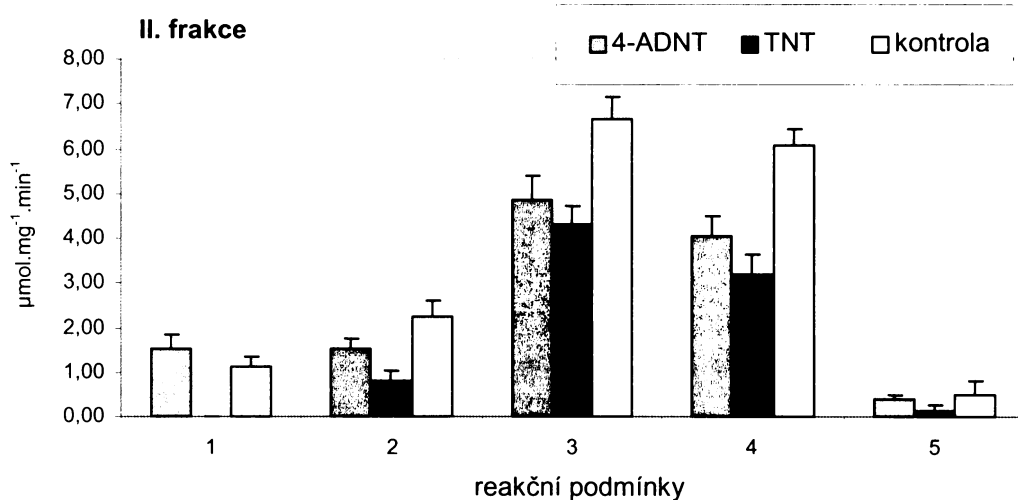
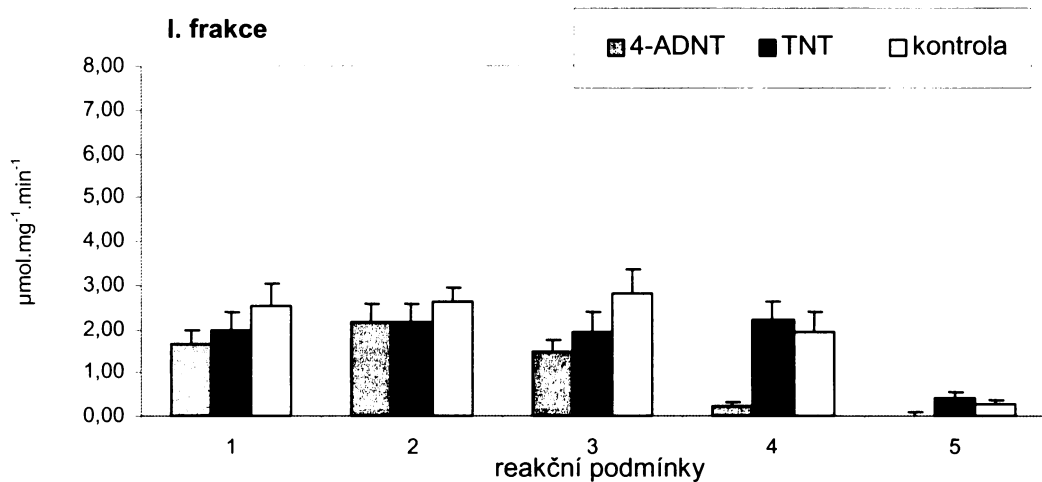


Graf 32. Inhibice růstu primárního kořene klíčících rostlin hořčice bílé v závislosti na koncentraci MNG v mediu.

1.3. ENZYMOVÉ STUDIE

1.3.1. Indukce exprese proteinů s nitroreduktázovou aktivitou

V tomto experimentu byla ověřována možnost zvýšení exprese enzymů podílejících se na detoxikaci nitrolátek v případě, kdy je rostlina respektive rostlinná buňka, vystavena vlivu těchto látek. K pokusu byla použita suspenzní kultura mydlice lékařské, které bylo do kultivačního media přidáno 9 hodin před extrakcí TNT (20 mg.dm^{-3}) resp. 4-ADNT (10 mg.dm^{-3}). Z buněk obou indukovaných skupin a kontroly byly získány homogenizací v tekutém dusíku hrubé extrakty, které byly dále rozděleny precipitací síranem amonným na dvě frakce I.- od 0 do 40 % saturace a II.- od 40 do 80 % saturace. Redukce substrátu jednotlivými frakcemi byla sledována u obou skupin a porovnána s kontrolou. Test probíhal za různých reakčních podmínek, jako substrát sloužil TNT, resp. 4-ADNT. Podle předpokladu byla specifická aktivita vyšší u II. frakce, zejména v případě TNT jako substrátu. Nejvyšší specifická aktivita byla naměřena u kontrolní skupiny, a to jak u I. frakce, tak i u II. frakce (Graf 33.).



podmínky:

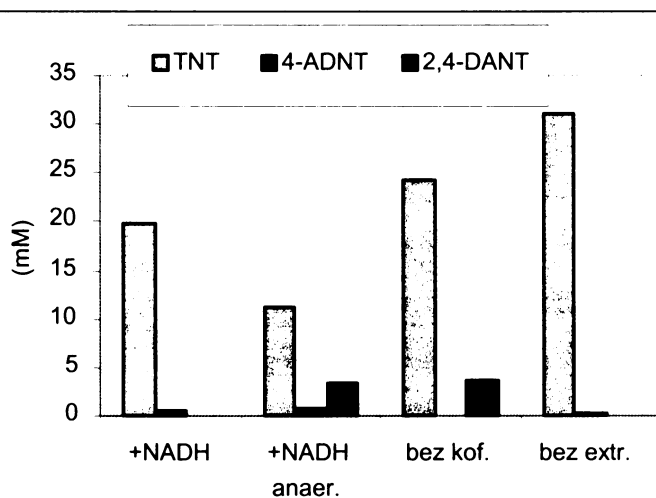
1. 4-ADNT (0,1mM), UDP-glc (0,2mM)
2. 4-ADNT (0,1mM)
3. TNT (0,2mM), NADH (1mM), katalasa (1,500 U cm⁻³), anaerobně
4. TNT (0,2mM), NADH (1mM), aerobně
5. TNT (0,2mM), aerobně

Graf 33. Specifická aktivita jednotlivých frakcí za různých reakčních podmínek.

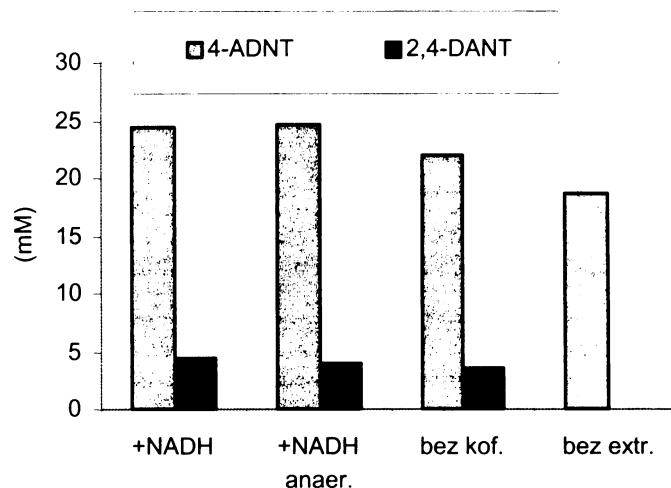
4.1.1 Izolace enzymu zodpovědného za první krok redukce TNT

K izolaci enzymu byla použita buněčná suspenze *Saponaria officinalis*. Dle růstové charakteristiky byl vybrán ke sklizni 15.den kultivace. K izolaci bylo použito 240 g buněk. Hrubý extrakt (217,2 mg) byl připraven homogenizací rostlinného materiálu v tekutém dusíku a odstraněním nežádoucích částí centrifugací. V hrubém extraktu byla testována aktivita pro TNT a jeho degradační produkty za různých podmínek; za přítomnosti NADH (1 mM) aerobně, NADH (1 mM), katalasy (1,500 U.cm⁻³) anaerobně, bez kofaktoru (Graf 34.-37.).

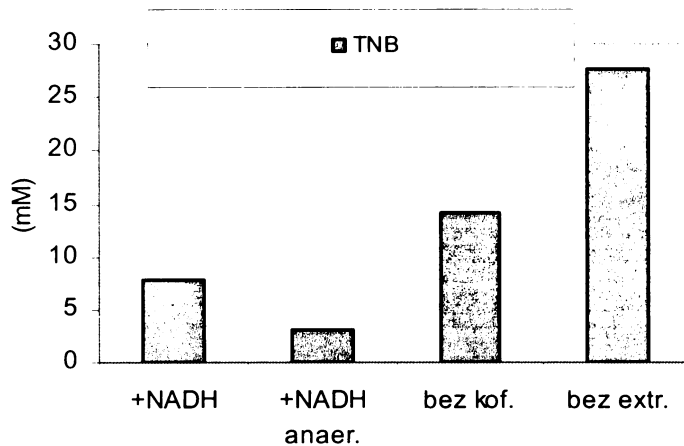
Enzymy obsažené v hrubém extraktu degradovaly zejména TNT a TNB. Úbytek substrátu byl nejvyšší za přítomnosti NADH (1 mM) a katalasy (1,500 U.cm⁻³) v anaerobních podmínkách, v aerobním prostředí reakce také probíhala, rychleji za přítomnosti kofaktoru. Při degradaci TNT vznikalo malé množství degradačních produktů 4-ADNT a 2,4-DANT. 2,4-DANT byl také detekován při degradaci 4-ADNT, degradační produkty nevznikaly bez přítomnosti extraktu. Degradace směsi diaminonitrotoluenů probíhala spontánně velmi pomalu, nezávisle na přítomnosti enzymového extraktu.



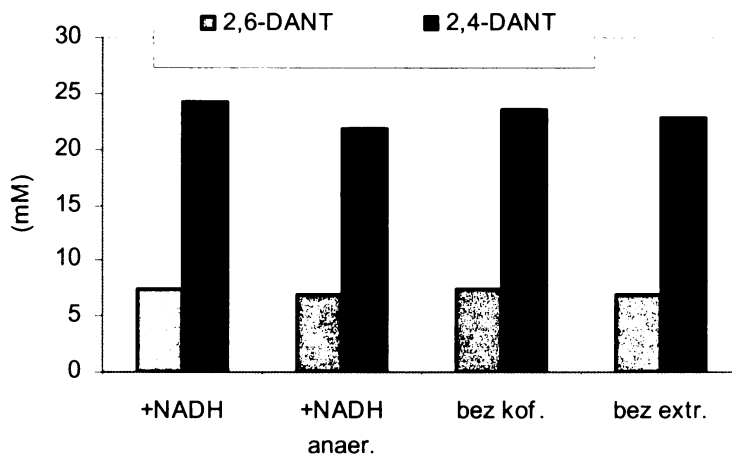
Graf 34. Test nitroreduktázové aktivity hrubého extraktu z mydlíce lékařské v případě TNT jako substrátu. Množství TNT a jeho degradačních produktů v reakční směsi po 2 hod. inkubaci za různých reakčních podmínek.



Graf 35. Test nitroreduktázové aktivity hrubého extraktu z mydlíce lékařské v případě 4-ADNT jako substrátu. Množství 4-ADNT a jeho degradačního produktu v reakční směsi po 2 hod. inkubaci za různých reakčních podmínek.

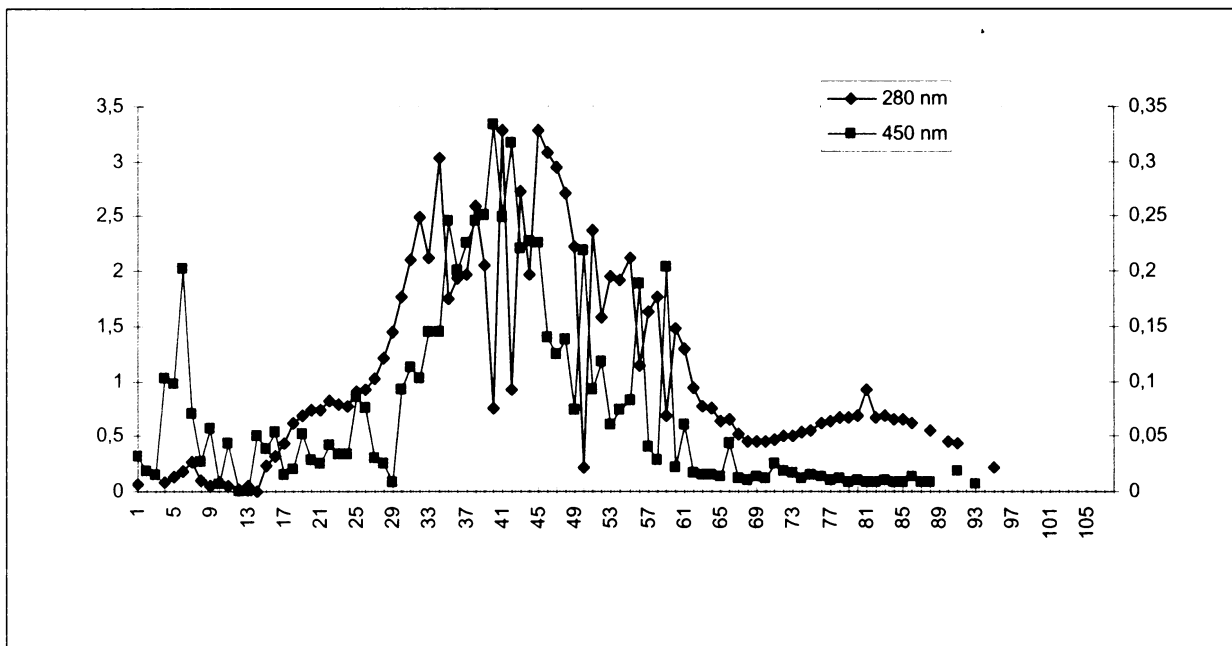


Graf 36. Test nitroreduktázové aktivity hrubého extraktu z mydlíce lékařské v případě TNB jako substrátu. Množství TNB v reakční směsi po 2hod. inkubaci za různých reakčních podmínek.

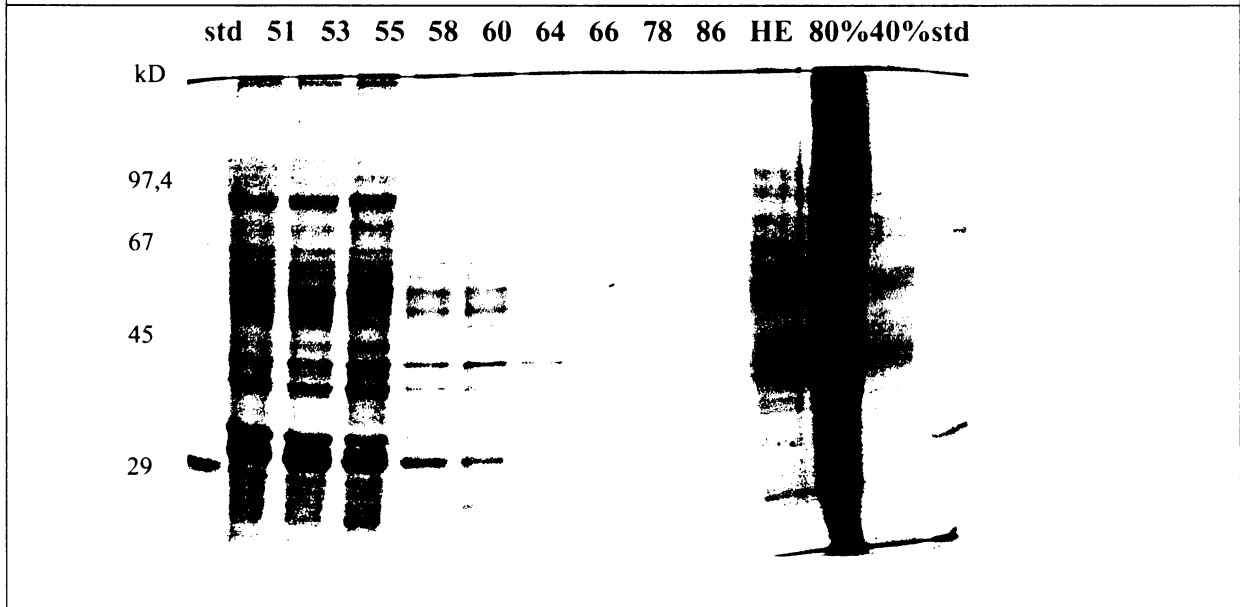
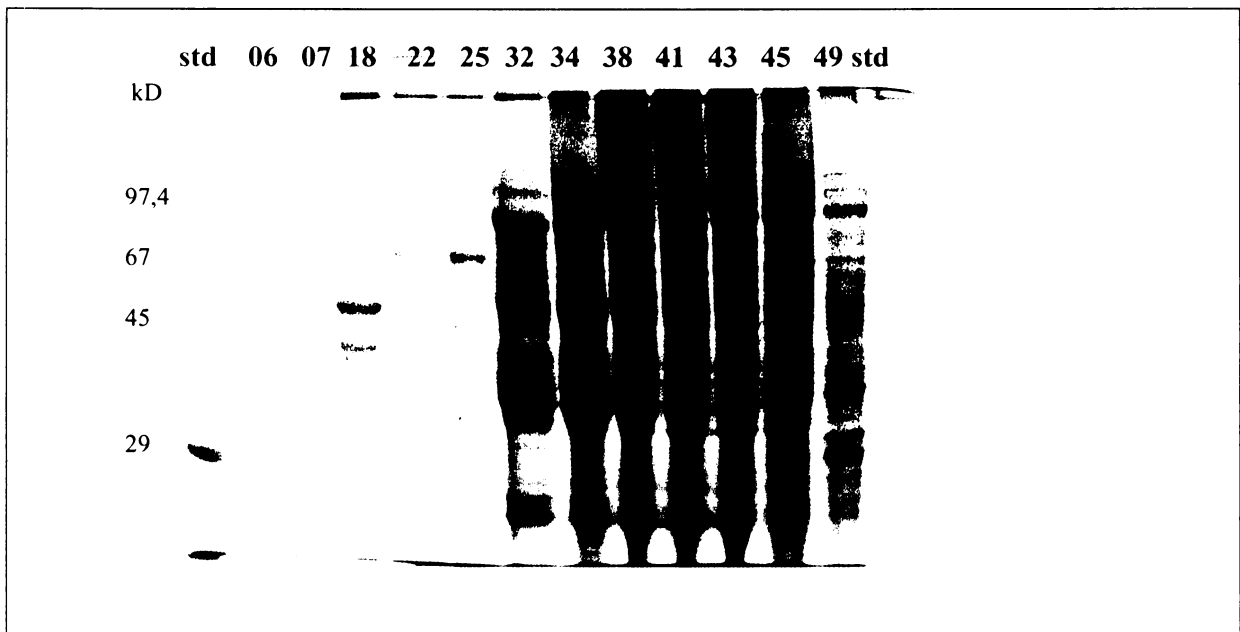


Graf 37. Test nitroreduktázové aktivity hrubého extraktu z mydlice lékařské v případě DANT jako substrátu. Množství DANT v reakční směsi po 2hod. inkubaci za různých reakčních podmínek.

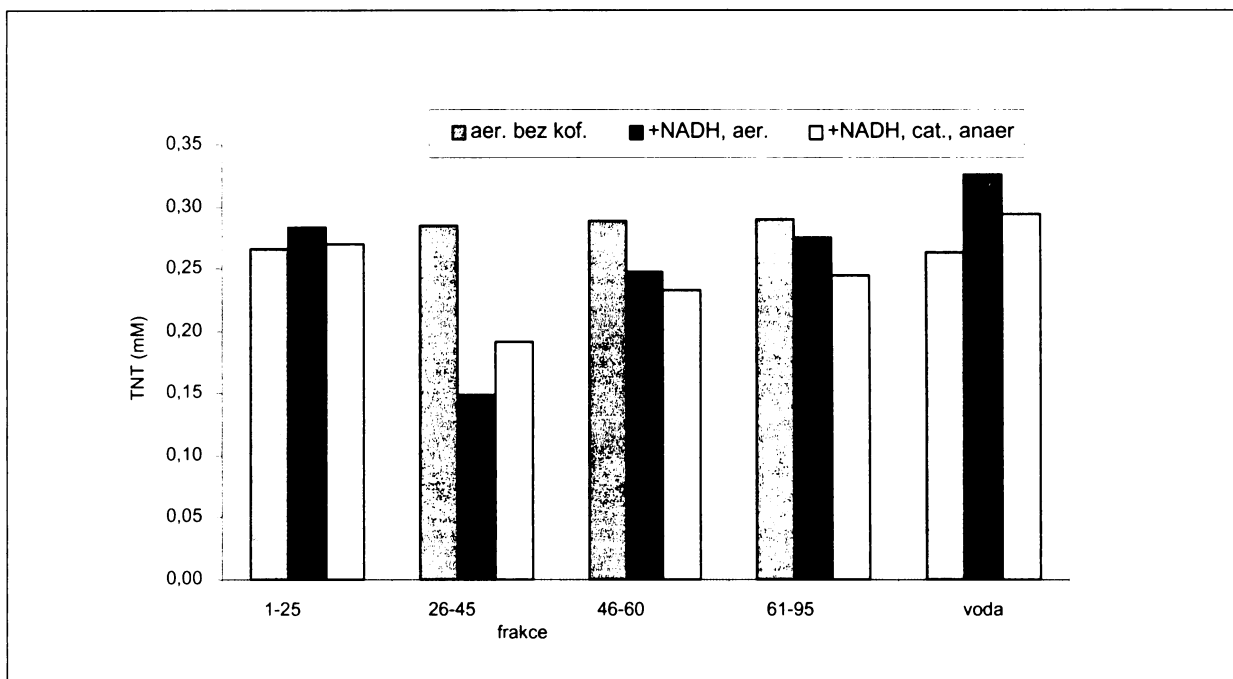
Hrubý extrakt byl dále rozdělen precipitací síranem amonným na dvě frakce I. od 0 do 40 % saturace (koncentrace bílkovin $1,02 \text{ mg.cm}^{-3}$) a II. -od 40 do 80 % saturace (konc. bílkovin $1,16 \text{ mg.cm}^{-3}$). Vyšší nitroreduktázová aktivita byla naměřena ve II. frakci. Enzymy této frakce byly dále děleny dle svého náboje na ionexové sloupcové chromatografii. Jako stacionární fáze byla použita DEAE celulóza, ekvilibrována 10 % glycerolem v 25 mM Tris-HCl (pH 9), k eluci byl použit lineární gradient KCl ($0-0,5 \text{ M}$, $0,2 \text{ dm}^{-3}$). Vzniklo tak 100 frakcí po 2 cm^3 , ve kterých byl stanoven obsah bílkovin (*Graf 38.*) a u vybraných frakcí byl sledován obsah enzymů pomocí SDS-elektroforézy (*Obr.32.*). Na základě získaných výsledků byly frakce dále spojeny následujícím způsobem 1-25, 26-45, 46-60 a 61-90. U těchto sloučených frakcí byla testována schopnost degradace TNT (*Graf 39.*).



Graf 38. Absorbance jednotlivých frakcí po ionexové sloupcové chromatografii.

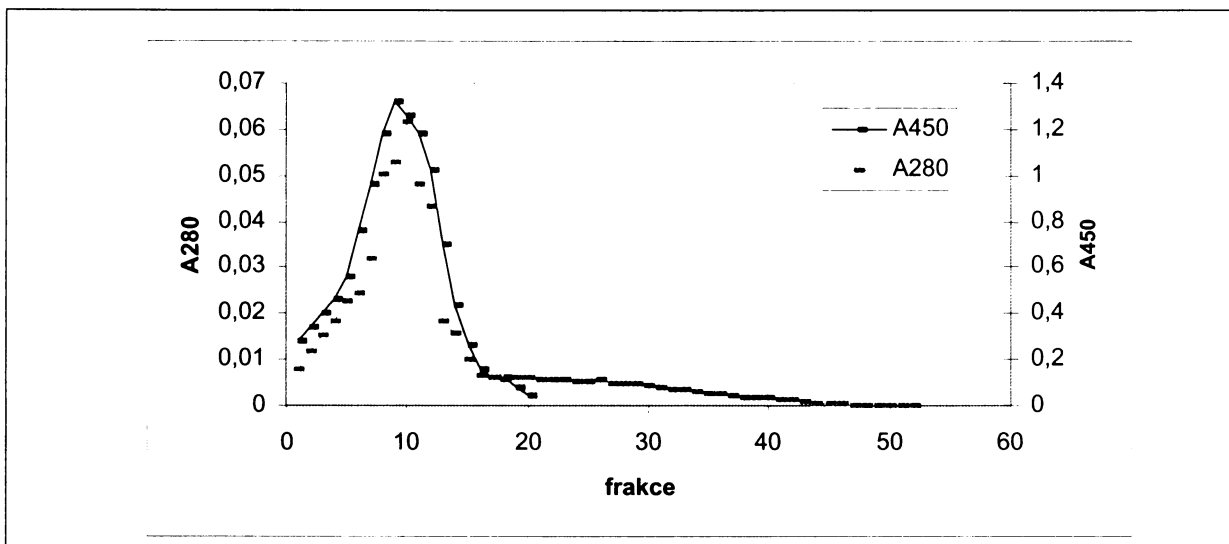


Obr. 32. SDS-elektroforéza vybraných frakcí po ionexové chromatografii. std –standard (SERVA), HE-hrubý extrakt

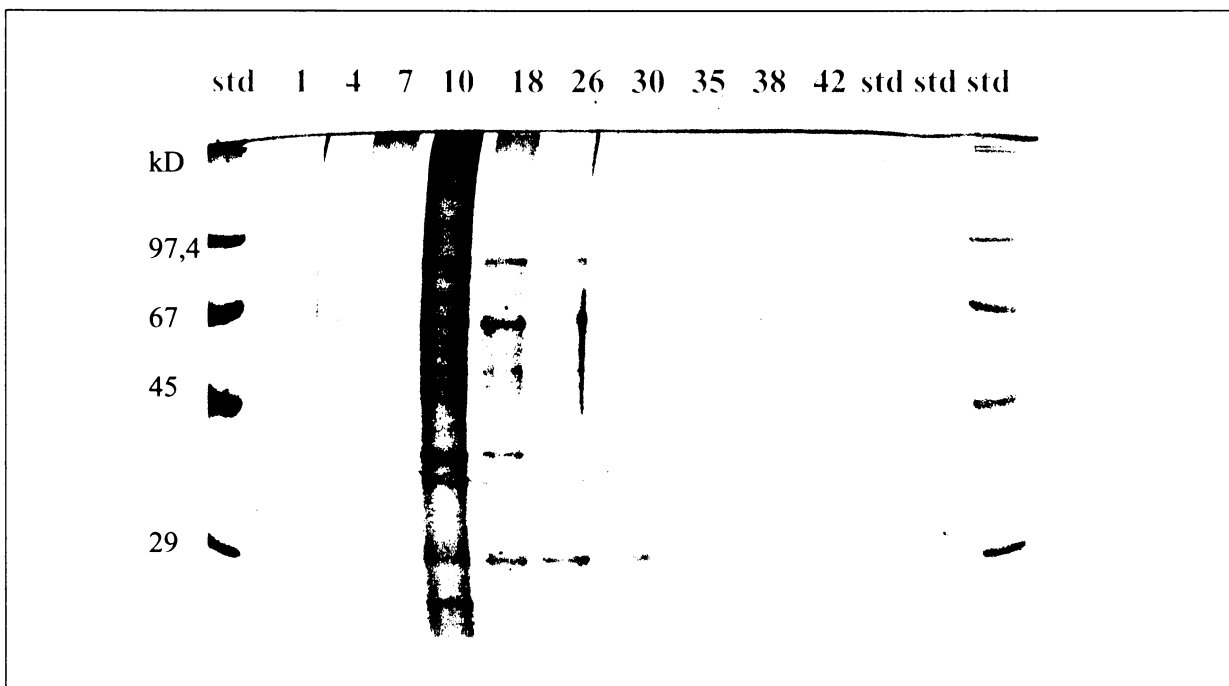


Graf 39. Test aktivity frakcí sloučených po ionexové chromatografii. Množství TNT v reakční směsi po 2hod. inkubaci za různých reakčních podmínek.

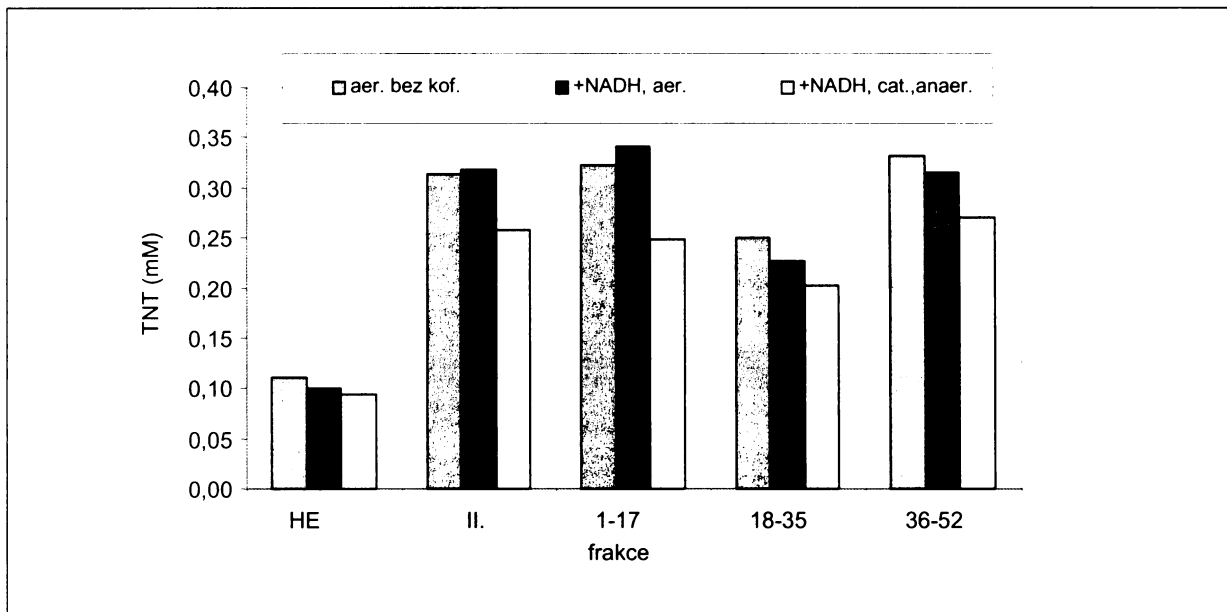
Frakce 46-60 vykazovala vysoký obsah bílkovin ($7,28 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a současně i poměrně vysokou nitroreduktasovou aktivitou. Tato frakce sloužila jako výchozí materiál pro další separaci na gelové sloupcové chromatografii, jako pevná matrice byl použit Sephadex G100. V získaných frakcích byla opět sledována absorbance při 280 nm a 450 nm, podle které lze usuzovat na množství bílkovin obsažených ve vzorcích (Graf 40.). Nitroreduktasová aktivita byla hodnocena dle úbytku TNT v reakční směsi spektrofotometrickou metodou dle Oh. Jak je patrné z obrázku (Obr. 33.) a následného grafu (Graf 41.), vysoký obsah bílkovin nekorespondoval s vysokou nitroreduktasovou aktivitou, která byla nejvyšší u sloučené frakce 18-35.



Graf. 40. Absorbance při 280 a 450 nm jednotlivých frakcí po gelové chromatografii

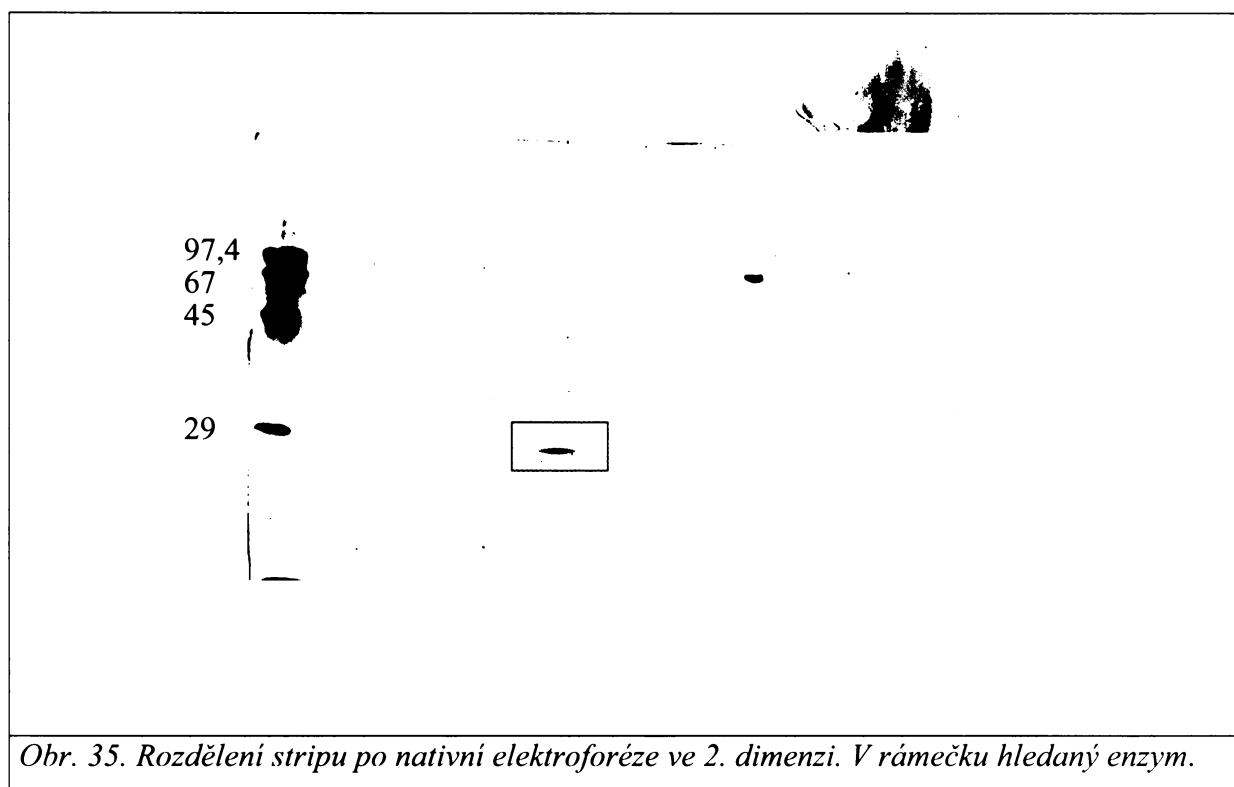
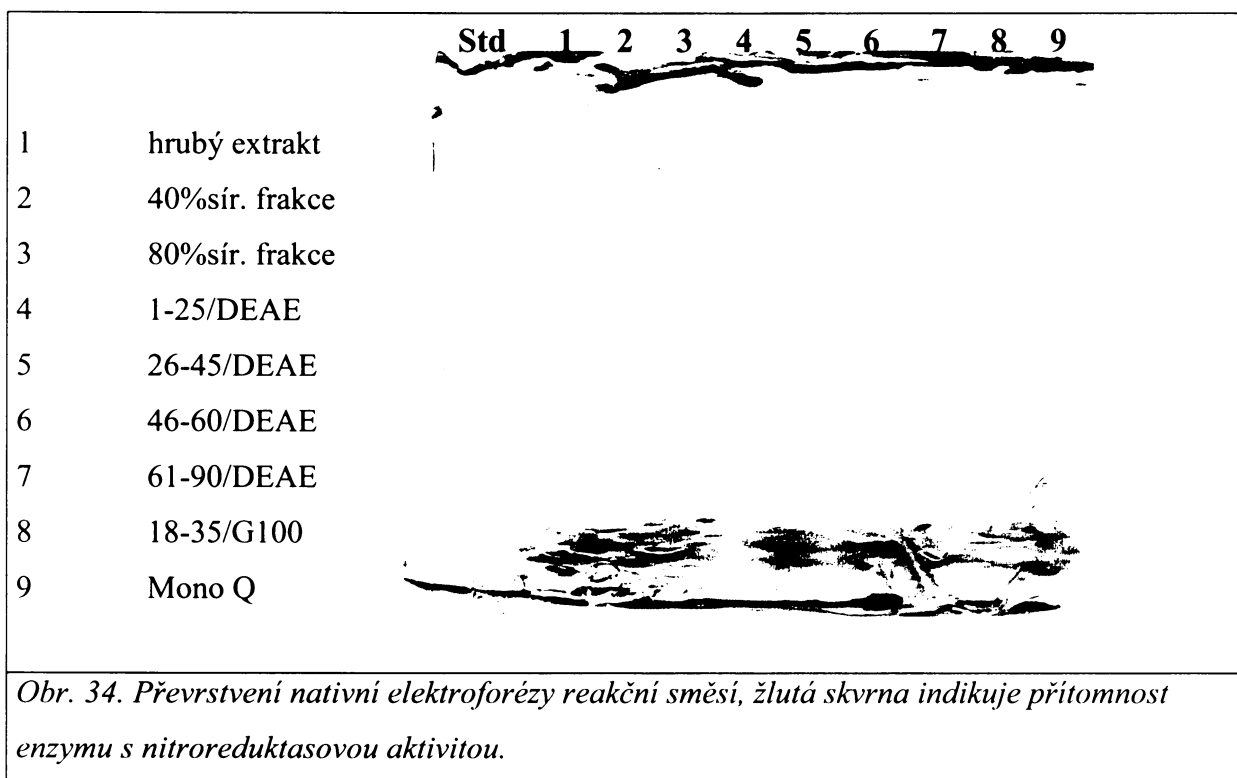


Obr. 33. SDS-elektroforéza vybraných frakcí po gelové chromatografii. std- standard (SERVA)



Graf. 41. Test aktivity frakcí sloučených po gelové chromatografii. Množství TNT v reakční směsi po 2 hod. inkubaci.srovnání s hrubým extraktem (HE) a frakcí II. po vysolení

Sloučená frakce 18-35 byla přečištěna pomocí FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) na koloně Mono Q. Enzymová aktivita pak byla testována přímo v gelu po nativní elektroforéze. Pro vizualizaci byl gel převrstven reakční směsí (1 % agarosa, 10 mM NADH, 0,3 mM TNT, 1,500 U.cm⁻³) a inkubován 1 hod. v argonové atmosféře. Podle očekávání byly po ukončení inkubace na gelu patrné žlutooranžové skvrny odpovídající místům s nitroreduktasovou aktivitou (Obr. 34.). Vyříznutý pruh gelu se žlutou skvrnou byl rozdělen v druhé dimenzi za přítomnosti SDS, molekulová hmotnost enzymu tak byla stanovena na přibližně 29 kDa (Obr. 35.)



Isoelektrickou fokusací byly rozlišeny dvě isoformy s pI 4,8 a 5,1. Molekulová hmotnost byla ověřena na hmotnostním spektrometru a činila 29 285 Da. Klasifikace enzymu

byla určena podle sekvence 17 terminálních aminokyselin na sekvenátoru využívajícím Edmanovo odbourávání. Nalezená sekvence SSGVDVAEFSPRRLLT byla srovnávána se známými proteiny v proteinové databázi (Blast Protein Data Bank). Nalezená sekvence vykazovala 66,7 % homologii se sekvencí SNGIDIAHFTRPRRL náležející k 12-oxophytodienoat reductase (OPR1) izolované z *Arabidopsis thaliana* (Biesgen a Weiler, 1999) a 60 % homologii se sekvencí SNGIDIAHFTRPRRL z rajčete (*Lycopersicon esculentum*) (Breithaupt a kol., 2001). OPR1 náleží ke skupině Old Yellow Enzyme (OYE, EC. 1.6.99.1)-flavoproteinu, který má jako prostetickou skupinu FMN a byl prvně izolován Theorellem v roce 1935 z kvasinek. (Theorell a kol., 1935)

4.2 DISTRIBUCE RADIOAKTIVITY V PRŮBĚHU DEGRADACE [¹⁴C] TNT.

1.3.2. Distribuce radioaktivity v průběhu degradace [¹⁴C] TNT in vitro kulturou regenerantů starčku přímětníku.

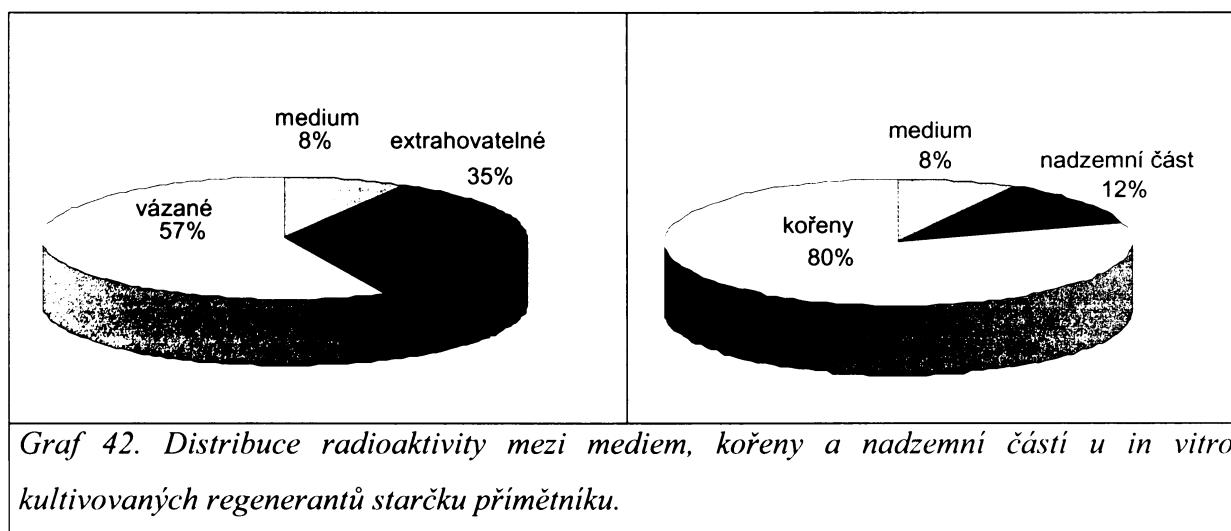
Rostliny starčku přímětníku (*Senecio jacobaea*) byly kultivovány *in vitro* jako regeneranty na mediu s přidavkem TNT (20 mg.dm⁻³) a ¹⁴C-TNT (cca 1,1 MBq.dm⁻³). Kultivace trvala 5 dní. Více než 90 % přidaného TNT bylo akumulováno do rostlin a dále metabolizováno. Distribuce TNT a jeho metabolitů byla sledována pomocí radiodetekce. Přehled distribuce radioaktivity do jednotlivých částí rostliny je shrnut do *Tab.20*. Na autoradiogramu je patrná akumulace radioaktivity v kořenové části, kde bylo detekováno až 80 % z vložené radioaktivity (*Graf 42.*). *Graf 43.* ukazuje rozložení radioaktivity mezi látkami extrahovatelnými do acetonu a látkami nerozpustnými. V rostlině bylo pevně vázáno 57 % radioaktivních látek, což u kořenů tvořilo 63 % z celkového množství radioaktivity naměřené v kořenech, v případě nadzemní části byla situace obdobná, převážná část metabolitů (56 %) nesoucích radioaktivní uhlík byla pevně vázána v buněčné stěně.

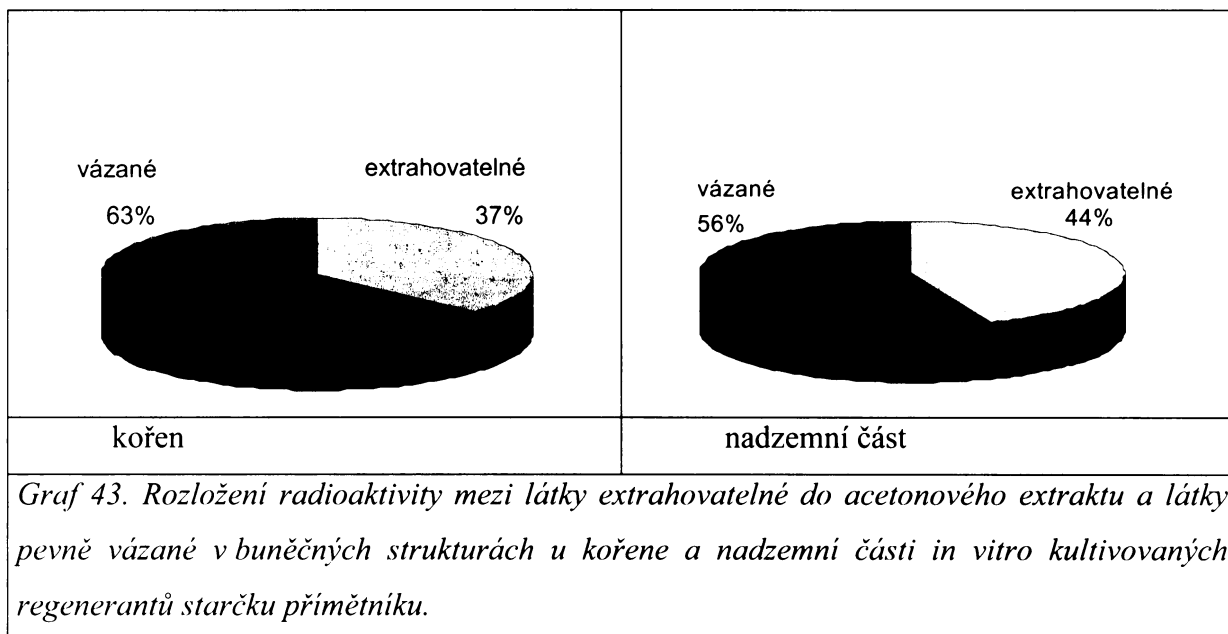
Tab. 20. Podíl radioaktivity v mediu a jednotlivých částech rostliny starčku přímětníku kultivované na mediu obsahujícím TNT a [¹⁴C] TNT.



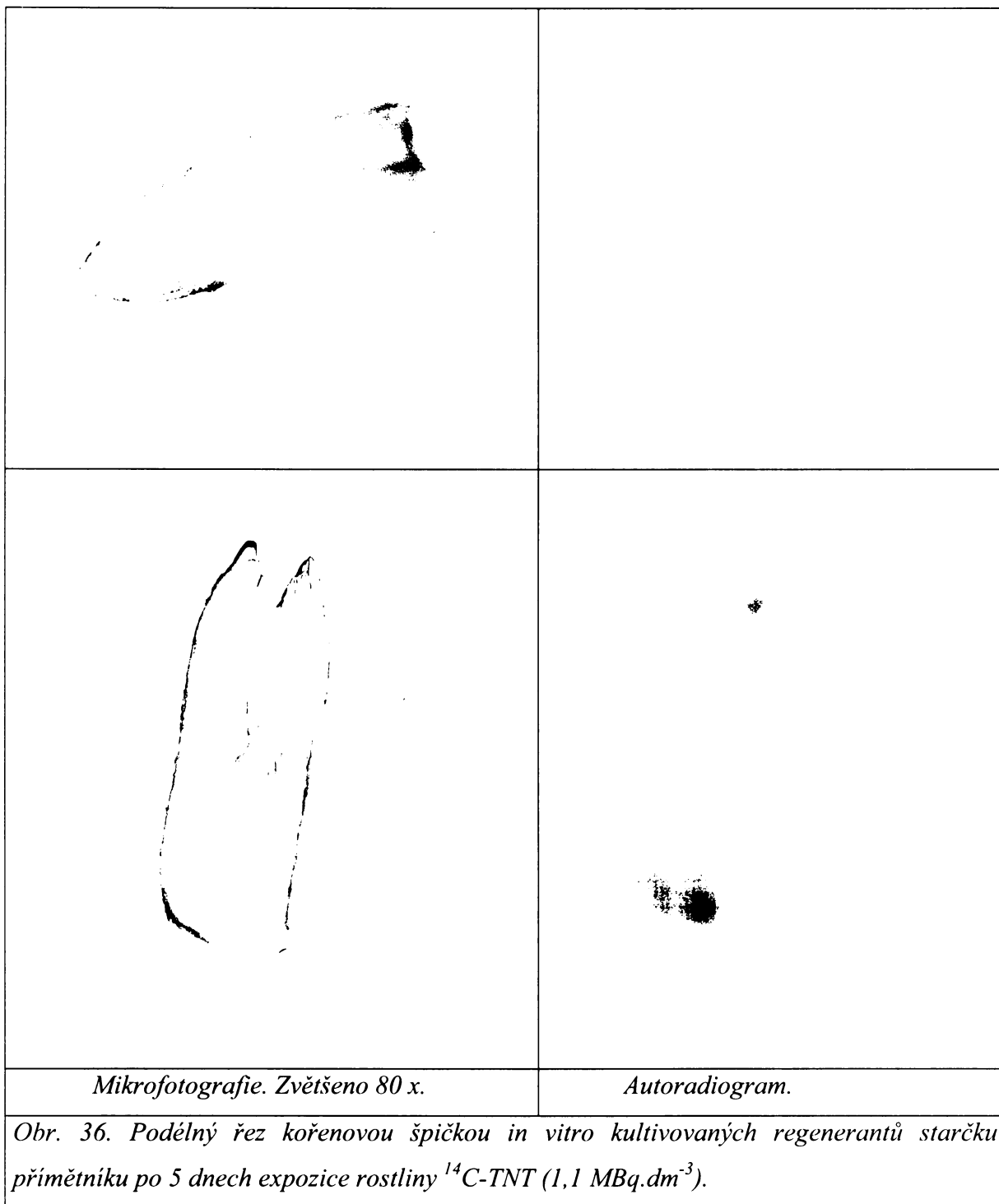
vzorek	Bq	%
medium před kultivací	97363	100
medium po kultivaci	8203	8,4
kořeny-acetonový extrakt	28941	29,7
kořeny-mineralizace	49122	50,5
nadzemní část-acetonový extrakt	4982	5,1
nadzemní část- mineralizace	6348	6,5
celkem	97596	100,2

Autoradiogram *S. jakobaea*.



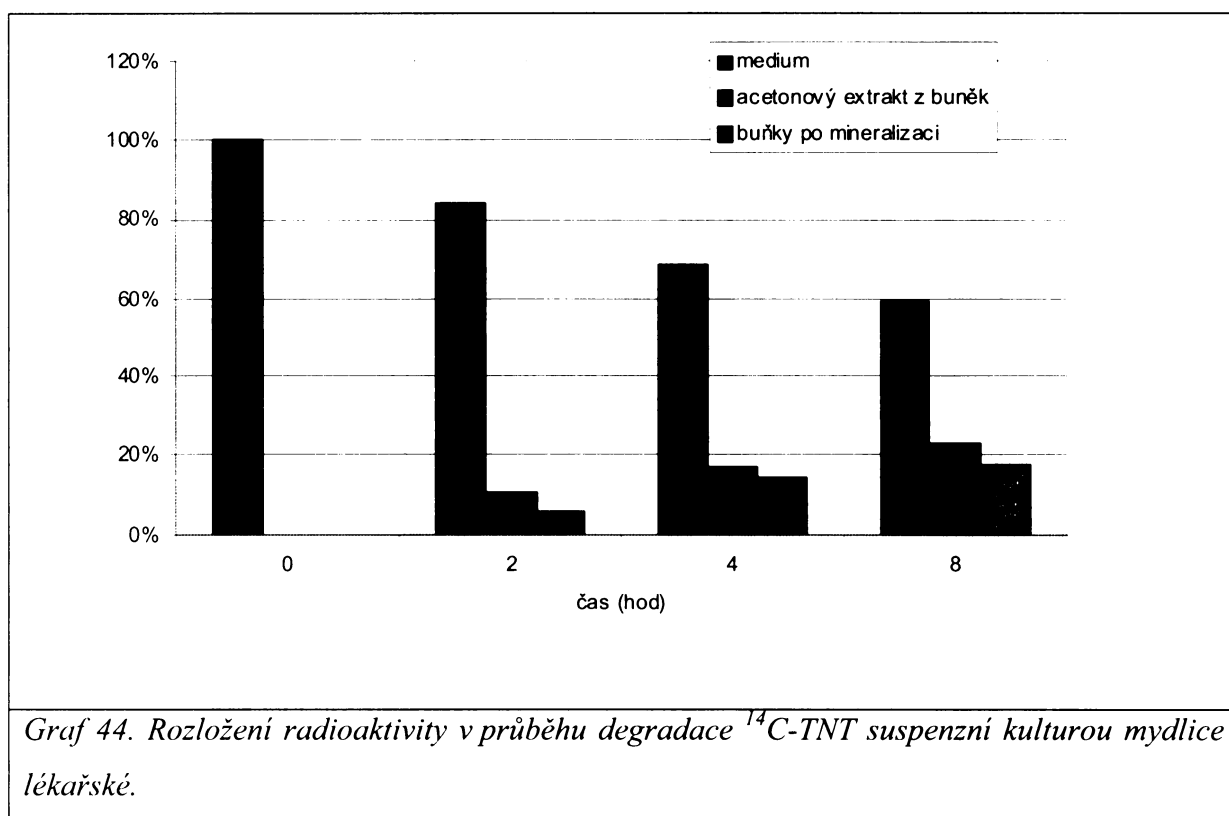


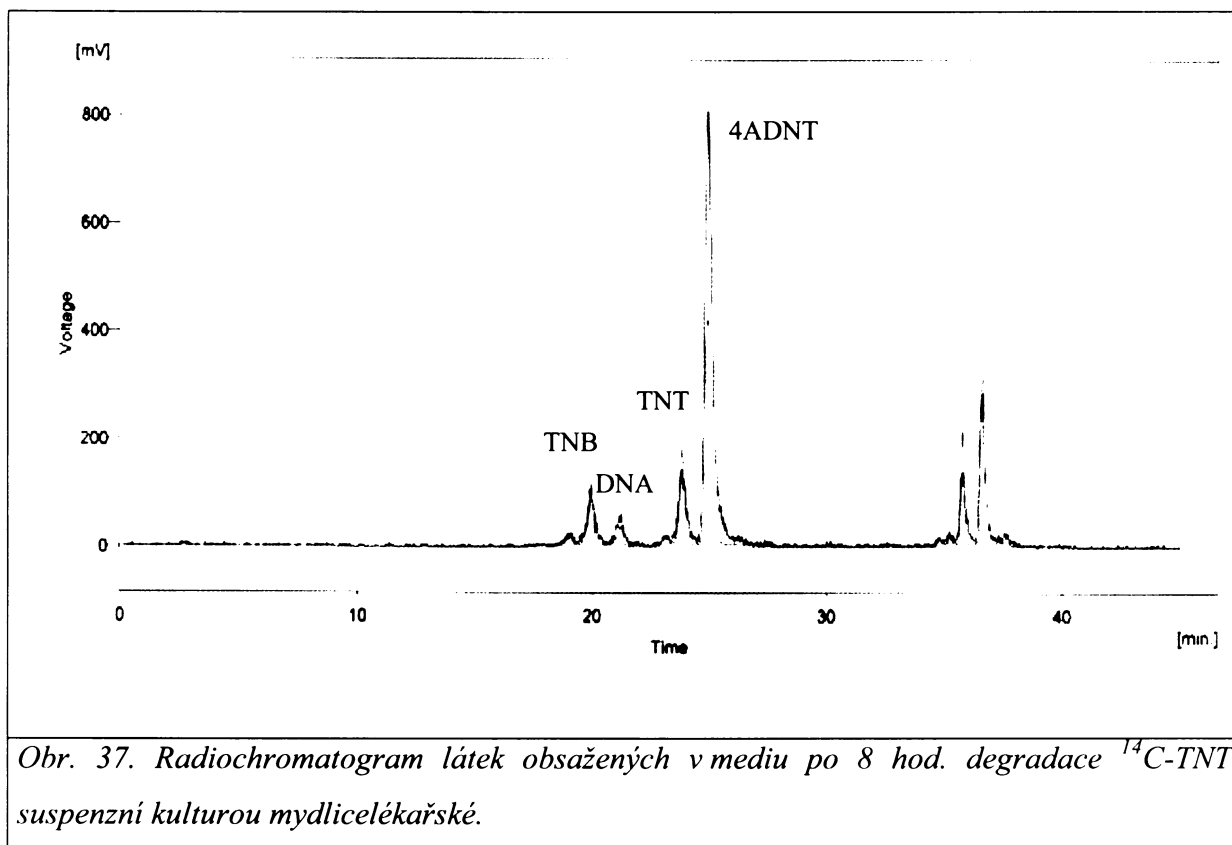
Ke sledování příjmu nitrosloučenin kořeny jsme využily kořenové špičky rostlin starčku z výše popsaného pokusu. Podélné řezy kořenové špičky o tloušťce přibližně 0,2 mm byly uloženy v radiodesce a po třech měsících vyhodnoceny. Autoradiogramy ukázaly nerovnoměrnou distribuci TNT a jeho degradačních produktů. Nejvíce radioaktivity můžeme vidět v oblasti kořenové čepičky. Zvýšená radioaktivita v místě řezu vznikla pravděpodobně narušením několika vrstev buněk (*Obr.36.*).



1.3.3. Distribuce radioaktivity v průběhu degradace [^{14}C] TNT suspenzní kulturou mydlice lékařské

Distribuce radioaktivity mezi médiem a buňkami byla sledována v průběhu degradace TNT suspenzní kulturou mydlice lékařské. V průběhu osmi hodin se podíl radioaktivity v buňkách zvyšoval, větší část tvořily látky extrahovatelné acetonem. Sloučeniny se zabudovaným značeným uhlíkem, které byly pevně vázány v buněčných strukturách, tvořily po 8 hodinách inkubace 17,8 % radioaktivity (Graf 44.). Radiochromatogram potvrdil přítomnost značeného uhlíku v předpokládaných meziproduktech degradace: 4-ADNT, TNB, DNA (Obr. 37.).





Obr. 37. Radiochromatogram látek obsažených v mediu po 8 hod. degradace ^{14}C -TNT suspenzní kulturou mydlicelékařské.

4.3 STUDIUM FYTOREMEDIACE NITROSLOUČENIN *IN SITU*.

1.3.4. Odbourávání nitroesterů v modelové čistírně odpadních vod.

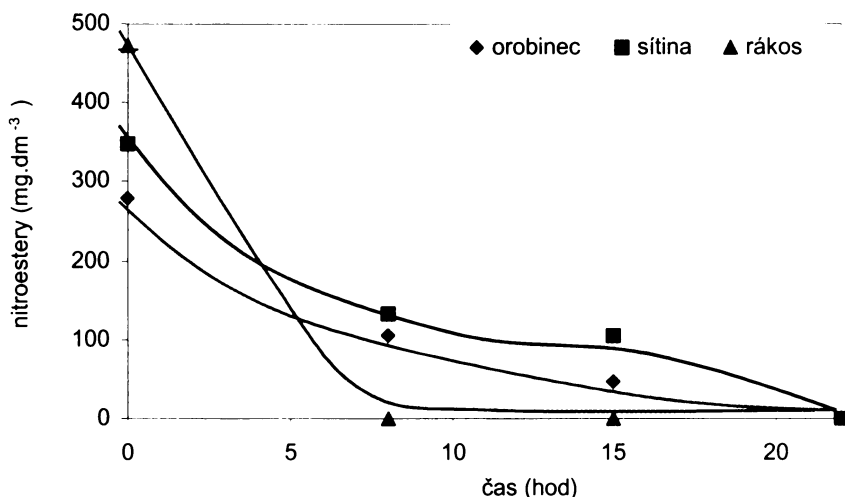
V roce 2004 byla zkonstruována modelová čistírna odpadních vod kontaminovaných při výrobě výbušnin nitroesterového typu. Kontejnery byly naplněny štěrkem a počátkem června osázeny mokřadními druhy rostlin orobincem sítinovitým (*Typha laxmanii*), sítinou sivou (*Juncus inflexus*), rákosem obecným (*Phragmites australis*), které pak kořenily v čisté vodě 14 dní. Odpadní voda byla načerpána do zásobníků. Cirkulace vody byla zajištěna čerpadly. Zásobníky kontaminované vody byly umístěny tak, aby byl umožněn návrat přečerpané vody samospádem (Obr. 38.).



Obr. 38. Modelová čistírna odpadních vod.

V roce 2004 proběhly tři experimenty. V prvním experimentu (25.6.-8.7. 2004) byla do zásobníků přečerpána neředěná odpadní voda z výroby, koncentrace nitroesterů v kontejnerech tak dosáhla rozmezí $800\text{-}2500\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, koncentrace dusičnanů $26,5\text{-}28,5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pH $7,7\text{-}8,8$. Příliš vysoké koncentrace jak nitroesterů, tak dusičnanů způsobily odumření rostlin. Kontejnery proto byly znovu osázeny a po 7 týdenním kořenění byl uskutečněn druhý experiment (2.9.-24.9. 2004). V tomto případě byla voda v zásobnících naředěna tak, aby koncentrace nitroesterů nepřesahovala $500\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrace nitroesterů v zásobnících klesla pod hranici detekovatelnosti během 3 týdnů (*Graf 45.*).

V posledním experimentu byla do zásobníků přidána nová odpadní voda, po naředění dosahovala koncentrace nitroesterů $280\text{-}540\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a dusičnanů $5\text{-}8\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při kontrolním odběru bylo naměřeno pH vody $2,5$, proto byl pokus ihned ukončen, a do kontejnerů načerpána čistá voda.



Graf 45. Odbourávání nitroesterů z odpadní vody různými druhy mokřadních rostlin v modelové čistírně.

V roce 2005 pokračovaly experimenty v modelové čistírně uvedené do provozu v předešlém roce. V polovině dubna byly kontejnery napuštěny nekontaminovanou vodou a dle stavu rostlinného porostu doplněny:

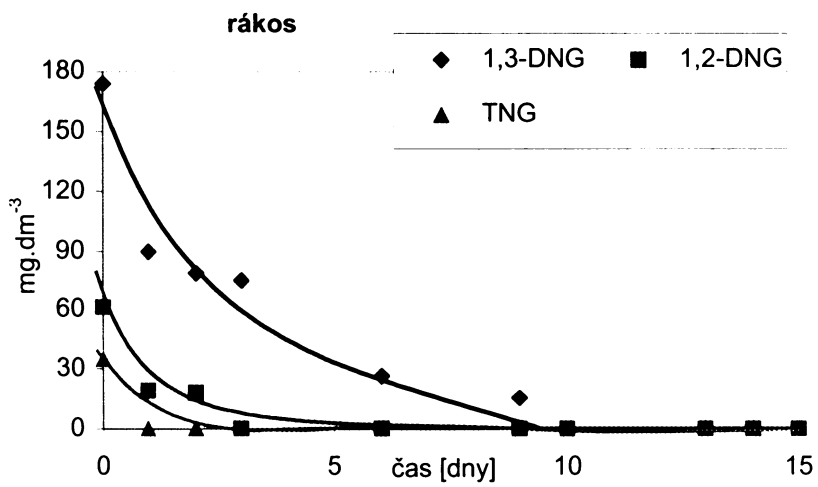
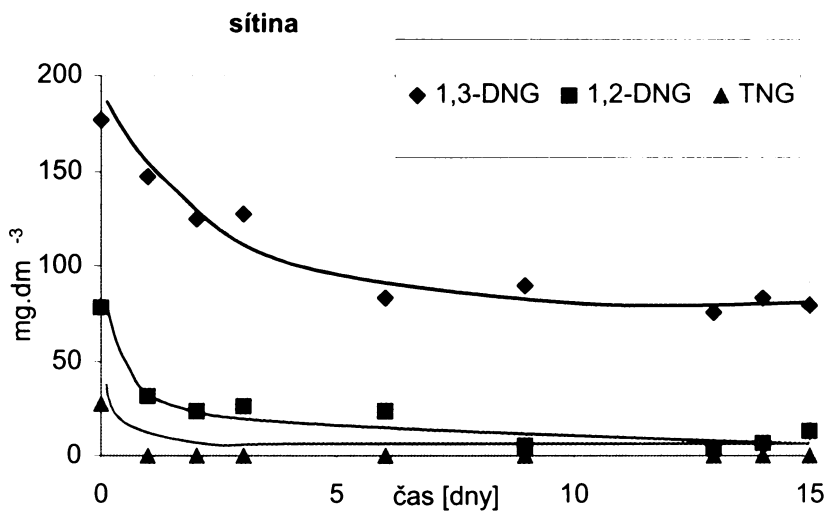
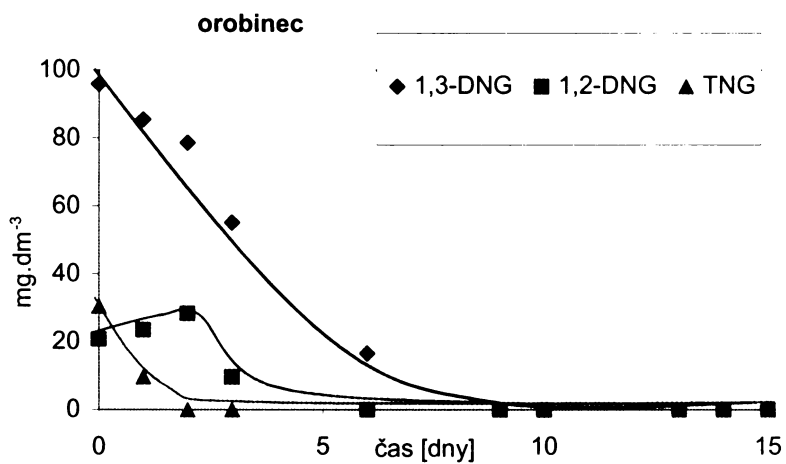
- kont. 1- *Typha laxmanii* (orobinec sítinovitý)—do volných míst dosazeny nové rostliny
- kont. 2- *Juncus inflexus* (sítina sivá)- nebylo třeba doplnit
- kont. 3- *Phragmites australis* (rákos obecný)- přidáno několik nových výhonků
- kont. 4 -*Iris pseudocorus* (kosatec žlutý)- původní kontrola byla osazena kosatci

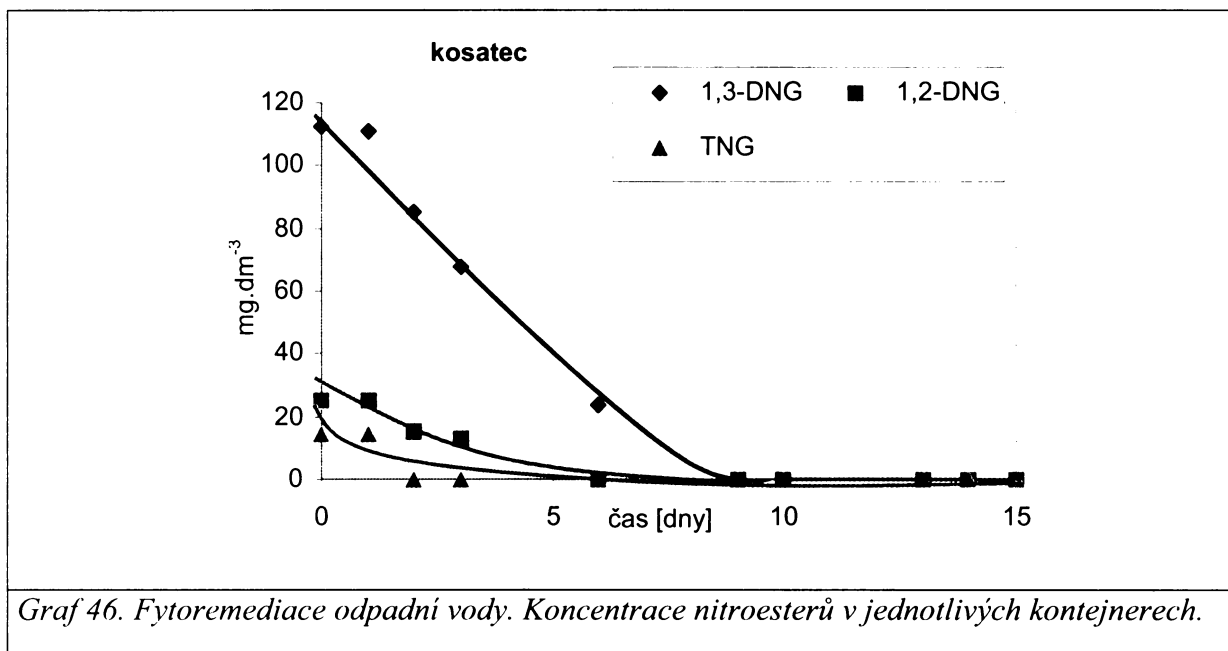
Odpadní voda z výroby měla pH 8,31, 8943,44 mg.dm⁻³ nitroesterů a 13,976 mg.dm⁻³ dusičnanů. Dle výsledků z minulého roku byla optimální koncentrace nitroesterů (300-500 mg.dm⁻³) pro fytořediční účely dosažena 20 násobným zředěním. Obsah dusičnanů byl natolik nízký, že nemohl negativně ovlivnit růst rostlin. Schopnost takto zkonstruované čistírny dekontaminovat odpadní vodu byla ověřena třemi po sobě následujícími pokusy. Pro třetí pokus byla použita nová zásobní voda o pH 7,93 a koncentraci nitroesterů 7289,6 mg.dm⁻³. Ve všech případech byla snížena koncentrace nitroesterů pomocí fytořediace pod hranici detekovatelnosti na HPLC do 14 dnů (Tab.21.). Průběh experimentů narušovaly problémy s častou poruchovostí čerpadel.

Tab. 21. Koncentrace nitroesterů v jednotlivých kontejnerech v průběhu fytoremediace. Žlutě- datum přidání nové odpadní vody.

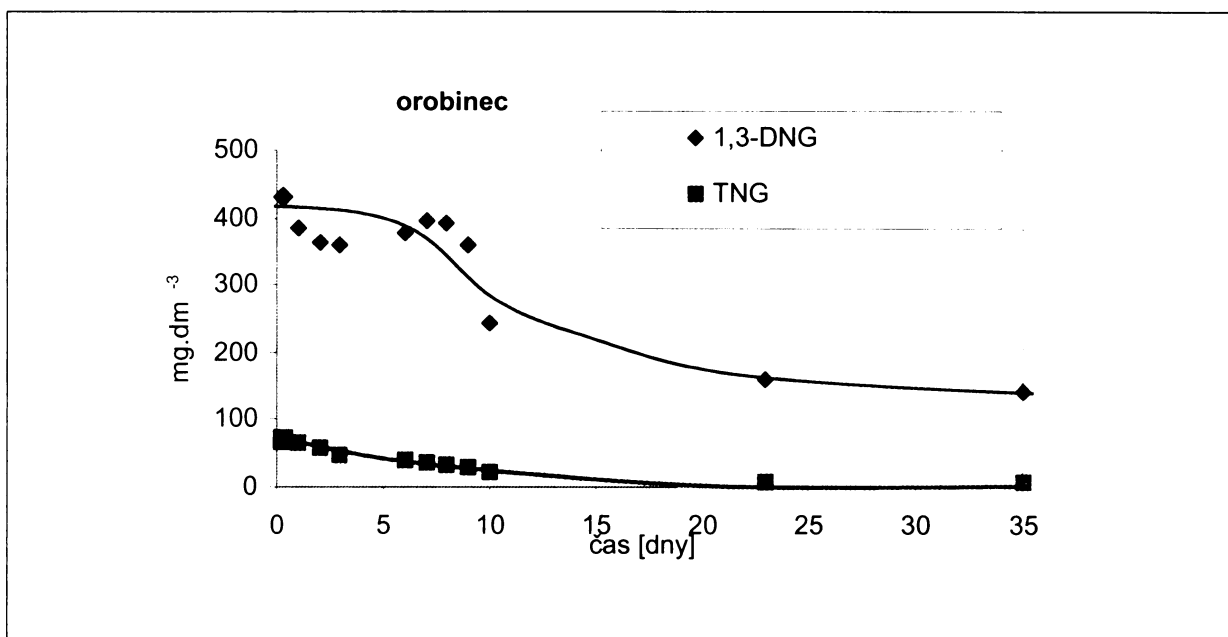
	1. kont.		2. kont		3. kont		4. kont		teplota vody
datum	mg.dm ⁻³	pH	mg.dm ⁻³	pH	mg.dm ⁻³	pH	mg.dm ⁻³	pH	°C
8.6.	450,0		450,0		450,0		450,0		
9.6.	251,8	6,6	248,7	6,7	257,0	6,6	227,2	6,6	12,0
21.6.	0,0	7,5	0,0	7,2	0,0	7,5	0,0	7,2	13,0
28.6.	450,0		450,0		450,0		450,0		
1.7.	185,7	7,7	161,2	7,7	163,1	7,8	159,3	7,9	13,0
14.7.	0,0	7,4	107,5	6,6	0,0	7,3	109,0	6,4	19,0
27.7.	0,0	7,5	7,5	7,6	7,5		0,0		20,0
2.8.	333,0	7,4	531,9	7,4	469,4	7,6	510,6	7,3	20,0
4.8.	138,9	7,1	0,0	7,3	154,8	6,8	179,2	6,8	19,0
11.8.	0,0		7,8		0,0		26,3		19,0
18.8.	0,0	7,6	0,0	7,6	0,0	7,4	0,0	7,3	18,0
25.8.	0,0	7,5	0,0	7,5	0,0	7,2	0,0	7,2	17,5
1.9.	0,0	7,7	0,0	7,6	0,0	7,4	0,0	7,3	17,5

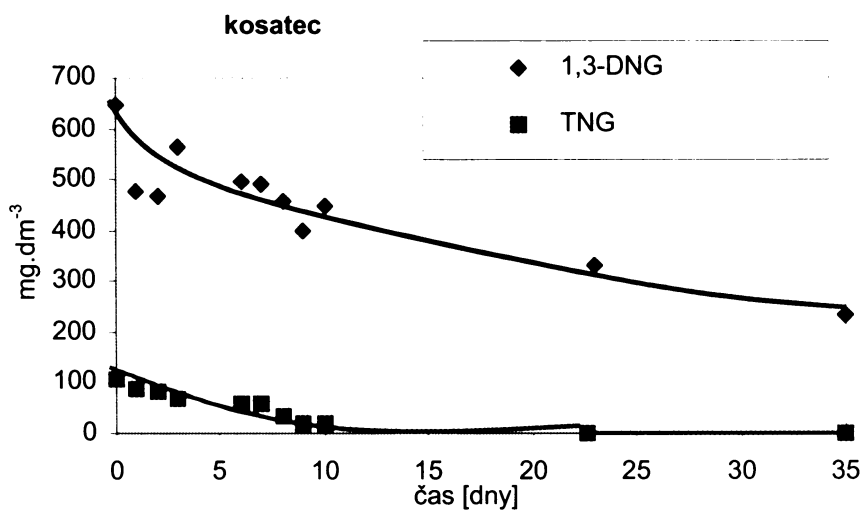
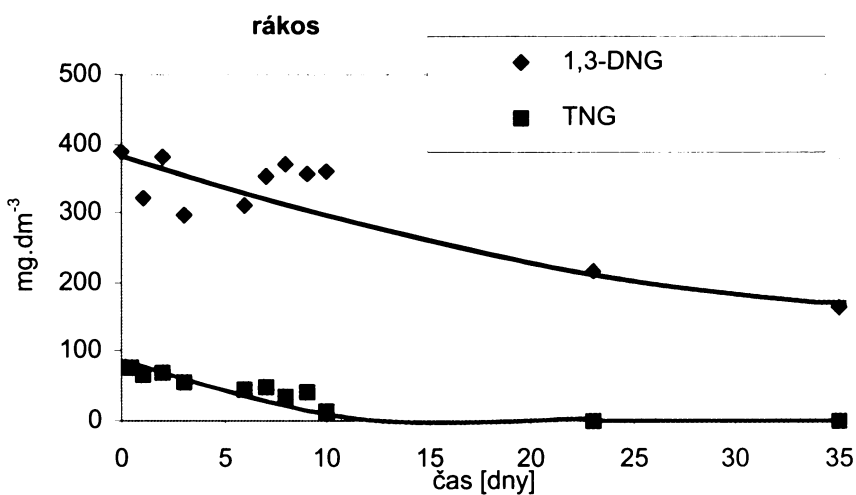
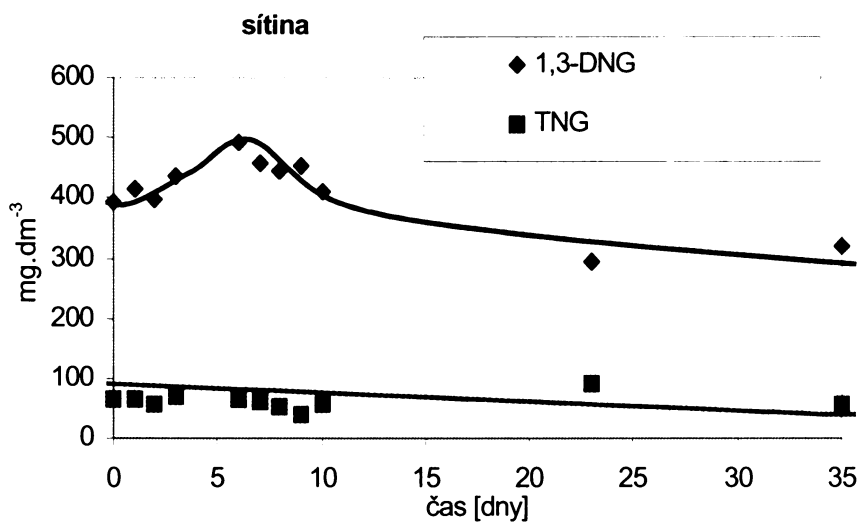
Ve čtvrtém experimentu na přelomu září a října byl úbytek nitroesterů sledován v kratších intervalech a zároveň byly zaznamenávány změny v zastoupení jednotlivých nitroesterů. Zásobní voda o pH 7,29 obsahovala nitroestery v celkové koncentraci 2218,143 mg.dm⁻³ a dusičnany v konc. 15,5 g.dm⁻³, pro experimenty byla 10x naředěna čistou vodou. Díky nižší vstupní koncentraci nitroesterů a velkému nárůstu rostlin se interval dekontaminace zkrátil na pouhých 9 dní, s výjimkou kontejneru osázeného sítinou, kde nedošlo k odstranění 1,3-DNG ani po 15 dnech (*Graf 49.*).





V posledním experimentu jsme zvýšili koncentraci kontaminované vody, zásobní voda byla naředěna v poměru 1:2. Z důvodu vysoké koncentrace nitroesterů, probíhala dekontaminace velmi pomalu, pokus byl ukončen pro nepřízeň počasí (teploty pod bodem mrazu). Polovinu původního množství nitroesterů se podařilo odbourat ve všech kontejnerech opět s výjimkou osázeného sítinou. Výsledky pro jednotlivé kontejnery jsou znázorněny v následujícím grafu (*Graf 47.*).

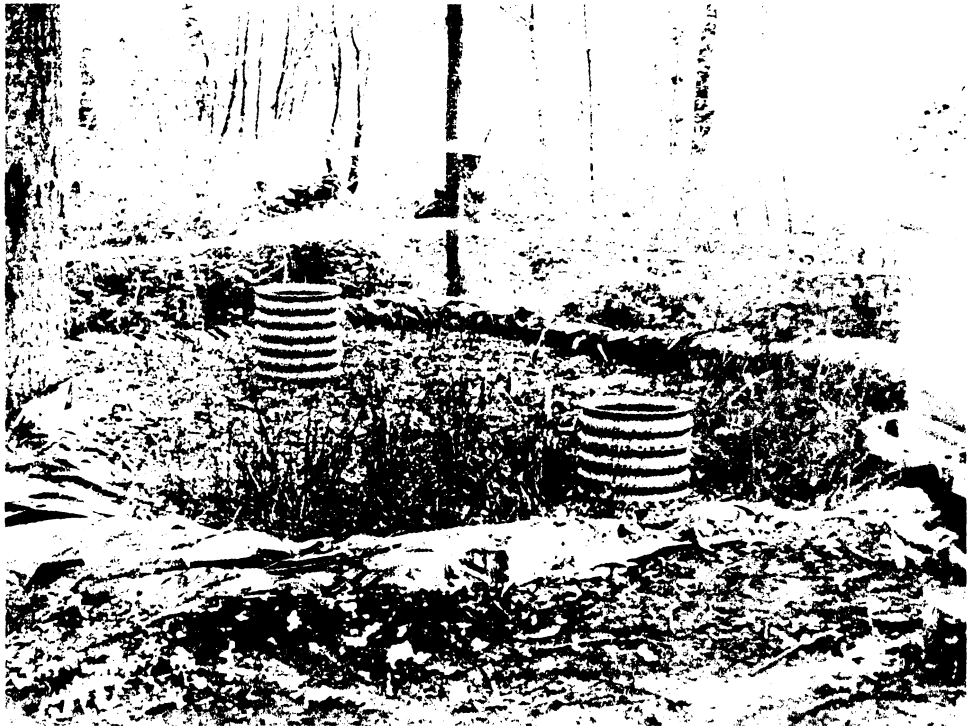
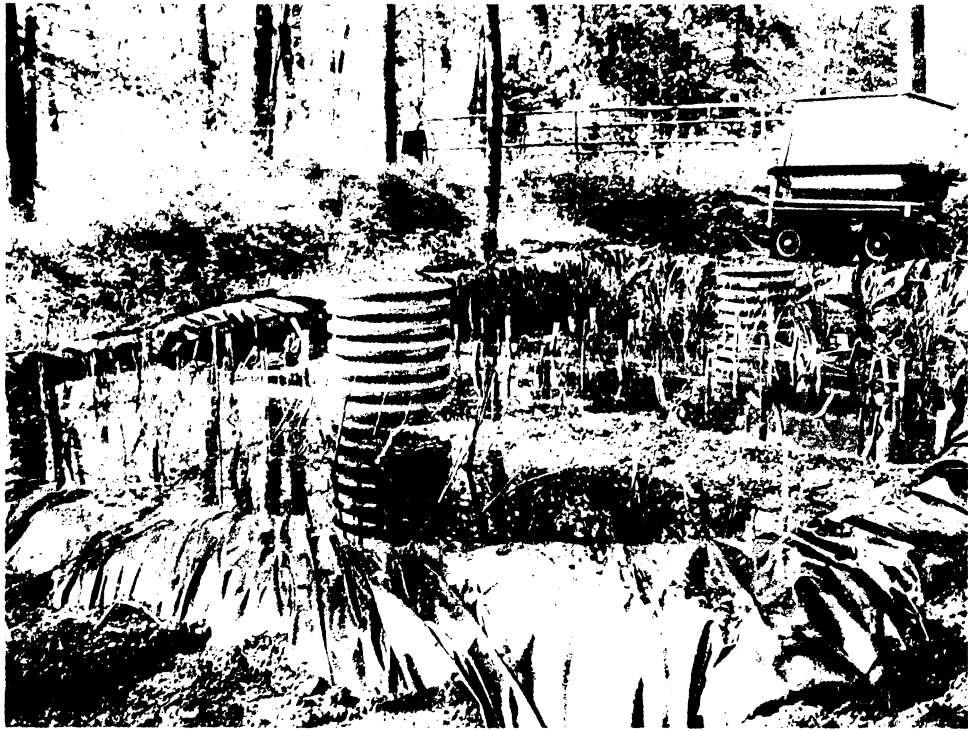




Graf 47. Fytoremediace odpadní vody. Koncentrace nitroesterů v jednotlivých kontejnerech.

1.3.5. Konstrukce umělého mokřadu.

V roce 2005 byl vytvořen a dán do provozu uměle vytvořený mokřad („laguna“) o objemu 5384 dm³ (Obr. 39.), který by měl sloužit jako kořenová čistírna odpadní vody při výrobě výbušnin. Odpadní voda musí být pro svou přílišnou koncentraci nitroesterů a dusičnanů a nestálost pH načerpávána do zásobníku a po kontrole pH a naředění je možno ji přečerpat do mokřadu . V květnu byl mokřad napuštěn čistou vodou a osázen mokřadními druhy : *Juncus inflexus* (sítina sivá), *Typha laxmanii* (orobinec sítinovitý), *Phragmites australis* (rákos obecný). Z důvodu pomalého růstu začaly pilotní pokusy na této čistírně až v srpnu.



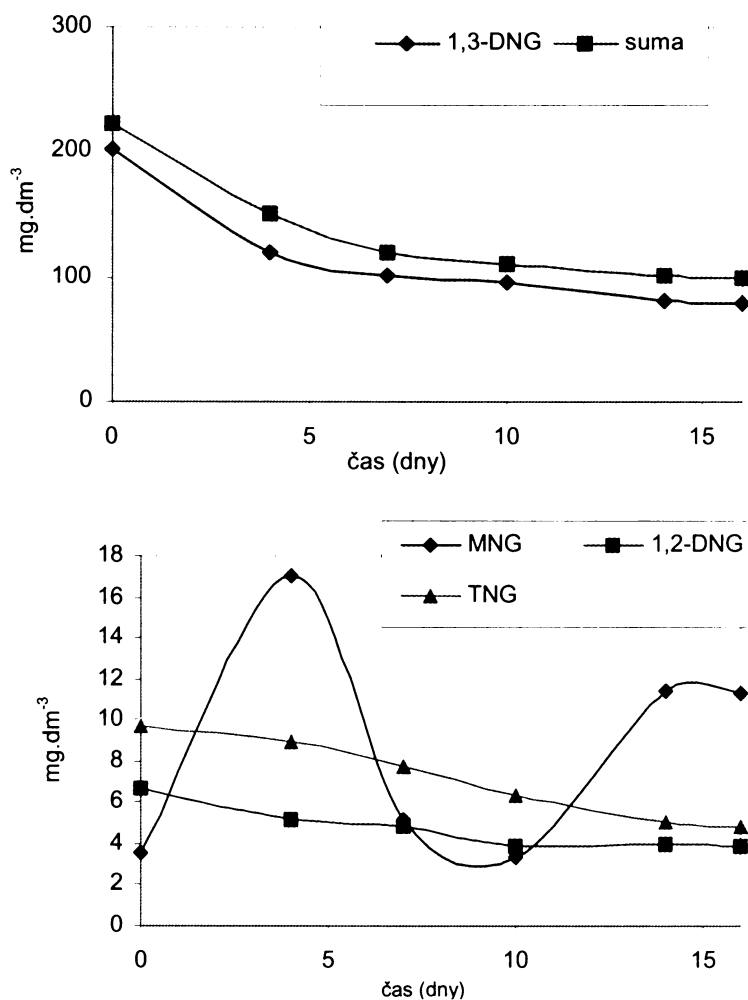
Obr. 39. Umělý mokřad.

Pro pokusy byla použita stejná odpadní voda jako pro pokusy v kontejnerech (konc.nitroesterů 7289,6 mg.dm⁻³). Voda byla 20x naředěna, míchání bylo prováděno čerpadlem 1x týdně 2 hodiny. Přestože porost mokřadu byl v tomto období ještě velmi chudý, bylo již možno pozorovat úbytek nitroesterů (*Tab. 22.*).

Tab. 22. Odbourávání nitroesterů v umělém mokřadu. Koncentrace nitroesterů.

	mg.dm ⁻³	pH
2.8.2005	364,5	7,33
11.8.2005	176,3	7,25
18.8.2005	68,6	7,2

V druhém experimentu, který započal 20.9. jsme sledovali postupnou degradaci nitroesterů, kdy majoritní část tvořily 1,3 DNG a TNG, který se postupně degradoval za vzniku obou izomeru DNG a MNG. Zásobní voda o pH 7,29 obsahovala nitroestery v celkové koncentraci 2218,143 mg.dm⁻³ a dusičnany v konc. 15,5 g.dm⁻³. 10x naředěná zásobní voda pak obsahovala přibližně 221,81 mg.dm⁻³ nitroesterů, v průběhu pokusu se koncentrace snížila na 99,1 mg.dm⁻³ (*Graf 48.*).

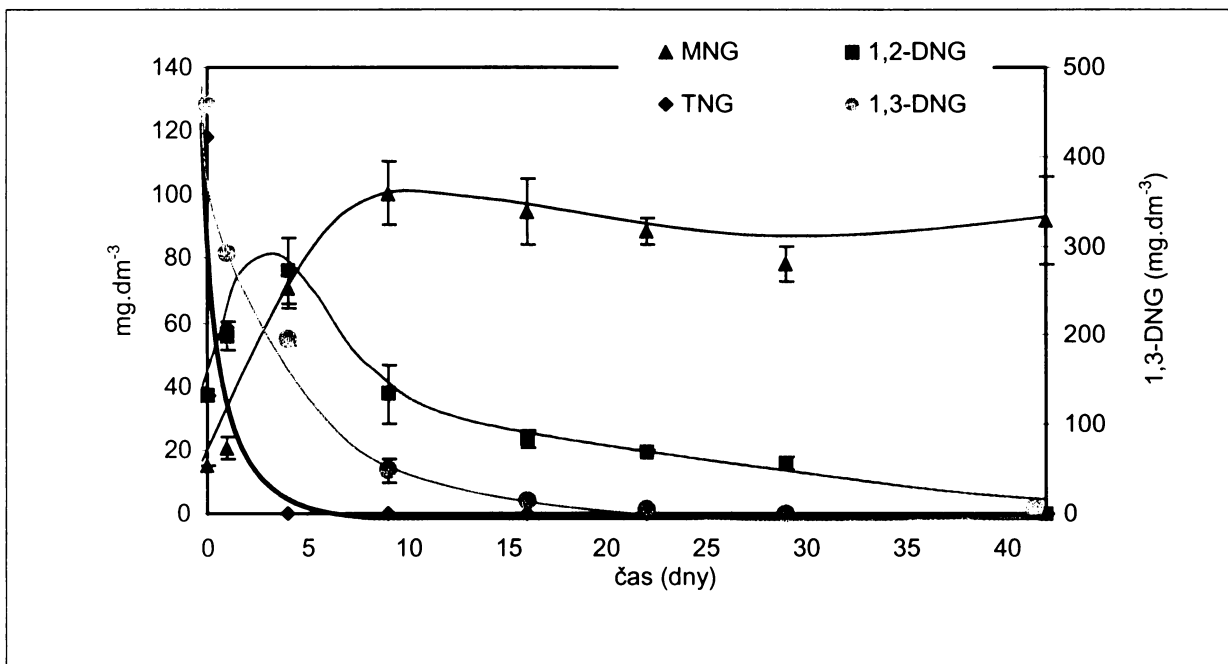


Graf 48. Zastoupení jednotlivých nitroesterů v průběhu fytoremediace odpadní vody v umělém mokřadu.

1.3.6. Odbourávání nitroesterů z odpadní vody v laboratorních podmínkách

Schopnost rostlin odbourávat nitroglyceriny z odpadní vody byla testována v laboratorních podmínkách. K experimentům byly použity *in vitro* kultury regenerantů rákosu (*Phragmites australis*). Odpadní voda z výroby výbušnin obsahoval největší množství 1,3 DNG (459 mg.dm⁻³) a TNG (120 mg.dm⁻³), jejich množství se v průběhu degradace rychle snižovalo, TNG byl za hranicí detekovatelnosti na HPLC již po 5 dnech, 1,3 DNG byl

odbourán za 22 dní. množství MNG jako degradačního produktu prudce narůstalo do 10 dne, dále jeho množství v médiu mírně klesalo (Graf 49.).



Graf 49. Odbourávání nitroesterů z odpadní vody in vitro kulturou regenerantů rákosu.

5 Diskuse

Kontaminace prostředí výbušninami představuje jeden z problémů životního prostředí. Nejvíce těchto látek bylo vyprodukováno během první a druhé světové války, ale i nadále jsou vyráběny a používány nejen k vojenským účelům, ale i v dalších oblastech lidské činnosti jako např. k získávání nerostných surovin, při demolici budov, při stavbě silnic a železnic. Důsledkem těchto činností a nezodpovědného přístupu při manipulaci a skladování těchto látek došlo v průběhu let k rozsáhlé kontaminaci půdy, a následkem vyplavování dále pak svrchní i podzemní vody.

Toxické účinky TNT a jiných nitrosloučenin na lidský organismus jsou známy více než 20 let. (Stiborová, 2002) V posledních letech se věnuje též pozornost toxickým účinkům těchto látek na rostliny, je sledován jejich příjem a degradace, zejména z hlediska možné akumulace těchto látek nebo jejich degradačních produktů s možností vstupu do potravinového řetězce. Z dostupných literárních pramenů vyplývá, že fyto toxické účinky nitroaromatických látek jsou závislé zejména na jejich koncentraci v rostlině, na rostlinném druhu a vývojovém stádiu rostliny (Hannink, 2002).

5.1 Vliv nitrosloučenin na růstové charakteristiky rostlin a *IN VITRO* KULTUR

Negativní vliv nitrosloučenin obsažených v půdě byl demonstrován na klíčivosti kulturních plodin v zemině odebrané přímo z místa kontaminace, která obsahovala až 2 mg.g^{-1} TNT, resp. až $9,5 \text{ mg.g}^{-1}$ DNT. Ani sedminásobné snížení koncentrace kontaminantů smísením kontaminované půdy se zahradním substrátem nepřispělo k normálnímu počtu klíčících rostlin, či vývoji semenáčků. Nejvyšší míru toxicity tolerovala ze zastoupených kulturních plodin slunečnice roční, jež vyklíčila ze 14 % při koncentraci TNT $0,928 \text{ mg.g}^{-1}$. Růst, i když velmi zpomalený, byl zpozorován u slunečnice při kontaminaci TNT v koncentraci $0,264 \text{ mg.g}^{-1}$ i na půdě kontaminované DNT v koncentraci $1,358 \text{ mg.g}^{-1}$. Po 31 násobném naředění kontaminovaných půd ($0,0969 \text{ mg.g}^{-1}$ TNT a $0,252 \text{ mg.g}^{-1}$ DNT) vyklíčily rostliny srovnatelně s kontrolou, růst byl negativně ovlivněn významně pouze u lnu setého, naopak vyšší nárůst biomasy na půdách obsahujících DNT byl pozorován u všech ostatních sledovaných druhů (tab 16.-17.). Lze se domnívat, že podpora růstu byla způsobena výskytem mikroorganismů, které jsou schopny využívat nitrosloučeniny jako zdroj uhlíku a dusíku (Lewis, 2003).

Vliv koncentrace TNT na růst rostlin byl také sledován na hydroponicky pěstovaných semenáčcích slunečnice roční. Toxický vliv TNT byl hodnocen po 14 denní kultivaci rostlin na mediu s TNT v koncentracích 10, 25, 50 100 mg.dm⁻³. Silně potlačený růst rostlin bylo možné sledovat již u koncentrace 10 mg.dm⁻³, rostliny kultivované na mediu s nejvyšší koncentrací tj. 100 mg.dm⁻³ zcela odumřely, což koresponduje s výsledky Palazzo a Leggeta (1986), kteří pozorovali inhibiční účinek TNT na hydroponicky kultivované rostliny šáchoru jedlého (*Cyperus esculentus*) již při koncentraci 5 mg.dm⁻³. Velmi zajímavé bylo zbarvení media a kořenů do červena, intenzita zbarvení stoupala s koncentrací TNT v mediu. Z analýz vyplynulo, že se jedná o konjugované fenolické látky. Protože se nejednalo o aseptickou kulturu nelze s jistotou říci, zda byly tyto látky produkovány rostlinami v důsledku stresu z přítomnosti TNT, nebo bylo toto zbarvení důsledkem přítomnosti specifických mikroorganismů(Obr.30.-31.).

Užití buněčných kultur ke studiu metabolismu má mnoho výhod, především degradační reakce probíhají velmi rychle a TNT při kultivaci ve tmě nepodléhá samovolné degradaci účinkem světla. Vliv TNT na růst suspenzní kultury byl testován na kultuře topolu černého (*Populus nigra*). Již při koncentraci TNT 25 mg.dm⁻³ bylo možné pozorovat snížení nárůstu, vyšší koncentrace působila přímo toxicky, nárůst buněk se zastavil. Po odeznění toxických účinků došlo k opětovnému růstu kultury, celkový nárůst byl ovšem 10x nižší než u kontrolní skupiny. Významným studijním materiálem se stala suspenzní kultura mydlice lékařské (*Saponaria officinalis*), která byla odvozena ze semen rostliny rostoucí na lokalitě zamořené TNT. Předpokládali jsme u ní větší odolnost vůči toxickému vlivu nitrosloučenin, což se potvrdilo v dalších experimentech. Koncentrace 25 mg.dm⁻³ TNT růstový faktor u této buněčné suspenze v podstatě neovlivnila, mírně snížený přírůstek byl zaznamenán pouze po tří denní kultivaci. Koncentrace 50 mg.dm⁻³ v TNT mediu způsobila v počátcích kultivace (do 7. dne) snížení nárůstu, který se po té obnovil a po 14 dnech dosahoval 90 % nárůstu kontroly (Graf 2.-3.). Suspenzní kultura mydlice byla proto vybrána jako modelový systém pro studium transformačních pochodů v rostlinách při metabolismu TNT a DNT.

Rozložení radioaktivity při degradaci [¹⁴C] TNT jsme sledovali u *in vitro* kultury regenerantů starčku přímětníku (*Senecio jacobaea*). Po 5 denní kultivaci bylo více jak 90 % radioaktivity akumulováno do rostliny, z tohoto množství 80 % v kořenech a 12 % v kořenech a listech. Zajímavé bylo porovnání látek pevně vázaných do buněčných struktur a látek extrahovatelných. V kořenech převažovaly látky pevně zabudované (63 %), v nadzemní části tvořily 56 % (Graf 43). Při obdobném experimentu s rákosem obecným (*Phragmites australis*) popisuje Nepovím (2005) vstup pouze 70 % radioaktivity do rostlin, z toho opět

přes 60 % do kořenů a 15 % do nadzemních částí. Model s postupným zabudováváním produktů degradace do buněčných struktur podpořily i výsledky experimentu se suspenzí kulturou mydlice. V průběhu degradace [¹⁴C] TNT bylo sledováno rozdělení radioaktivity v mediu, v acetonovém extraktu z buněk a v buněčných strukturách. Vzorky odebírané po 2,4 a 8 hodinách ukázaly na postupné ubývání radioaktivity z media a její akumulaci v buňkách (Graf 44.).

5.2 DEGRADAČNÍ STUDIE

5.2.1 Trinitrotoluen

Degradace TNT v rostlinných buňkách může probíhat obdobně jako u mikroorganismů dvěma směry. Nejčastěji dochází k redukci jedné či dvou nitroskupin za vzniku hydroxylamino nebo aminoskupiny, přičemž hydroxylaminodinitrotolueny nebyly v rostlinách dosud identifikovány. Druhá méně obvyklá cesta vede přes oxidaci methylskupiny či přímo aromatického kruhu. První tuto metabolickou dráhu popsal u rostlin Bhadra v roce 1999, když v kultuře stolítku vodního identifikoval kromě redukčních metabolitů i 2-amino-4,6-dinitrobenzoovou kyselinu, 2,4-dinitro-6-hydroxy-benzyl alkohol, 2-*N*-acetoxyamino-4,6-dinitrobenzaldehyd, 2,4-dinitro-6-hydroxytoluen.

Účinnost degradace TNT hydroponicky pěstovanými semenáčky slunečnice roční závisela na počáteční koncentraci, podle předpokladu byla nejvyšší u rostlin kultivovaných na velmi nízké koncentraci TNT (10mg.dm⁻³). V mediu byly kromě TNT detekovány jeho degradační produkty 4-ADNT a 2-ADNT v koncentraci do 0,5 mg.dm⁻³. Degradační produkty byly nalezeny i v rostlině a to zejména v kořenech (1,26mg.g⁻¹), stonek obsahoval 0,72 mg.g⁻¹ a listy pouze 0,12mg.g⁻¹ 4-ADNT (Graf 4.-5.). Hromadění TNT a jeho degradačních produktů v kořenech popisují i další autoři např. Cataldo a kol.(1989) u hydroponicky pěstovaných rostlin sóji a Thompson a kol. (1998) u topolů. Degradace TNT u hydroponických kultur byla dána součinností rostlinného metabolismu s mikrobiálním, k objasnění metabolických pochodů detoxikace u rostlin bylo potřeba použít kultury kultivované v aseptickém prostředí, a proto další pokusy probíhaly na *in vitro* kulturách regenerantů nebo suspenzních kulturách. Schopnost rostlin degradovat nitrosloučeniny byla testována na *in vitro* kulturách regenerantů topolu a hybridu topol x osika. Tyto kultury byly

pěstovány 31 dní na mediu s přidavkem TNT v koncentraci 100 mg.dm^{-3} , vzorky media byly analyzovány co do obsahu TNT i jeho degradačních produktů. Úbytek TNT z media byl rychlejší u kultur topolu, po 14 dnech dosáhl 80 % a dále neklesal, u hybridu osiky byl pokles koncentrace TNT pomalejší, ale na konci experimentu dosáhl také 80 %. V mediu byly také nalezeny jak produkty redukce nitroskupiny 4-ADNT a 2-ADNT, tak i překvapivě TNB jako produkt oxidačního metabolismu TNT. Oxidace methylové skupiny byla popsána u rostlin jen v několika málo případech a tato cesta degradace TNT je zatím velmi málo prozkoumána. (Hannink, 2002)

V mediu suspenzní kultury mydlice během osmihodinové degradace TNT byly detekovány pouze redukční metabolity 4-ADNT a 2-ADNT na rozdíl od buněk, ve kterých byl identifikován i produkt oxidační cesty trinitrobenzen (TNB) (*Graf 8. a 9.*). Při použití suspenzní kultury konopí setého bylo nalezeno podobné spektrum degradačních produktů. degradace v porovnání s kulturou mydlice probíhala pomaleji, což mohlo být způsobeno i vyšší vstupní koncentrací (mydlice – 60 mg.dm^{-3} , konopí - 100 mg.dm^{-3}). V průběhu experimentů bylo po určité době možno pozorovat i postupný úbytek degradačních produktů, proto v dalších pokusech jsme sledovali jejich metabolismus v suspenzních kulturách mydlice a lnu a dále u hydroponicky pěstovaných slunečnic. Všechny výše popsané produkty metabolismu TNT byly dále degradovány, rychlost úbytku z media byla u suspenzních kultur několikanásobně vyšší. Ve všech systémech nejrychleji z media vymizel TNB, v případě mydlice byl při jeho degradaci identifikován dinitroanilín, který sám podléhá další degradaci (*Tab. 19.*). Jeho přítomnost v metabolické cestě TNT byla předpokládána Riverou (1998)

5.2.2 Dinitrotoluen

Dinitrotolueny jsou jedovaté látky, vyskytující se především jako intermediaty při výrobě polyuretanových pěn, barviv, výbušnin a pohonných hmot, stejně jako jiná xenobiotika se tak dostávají i do půdy i vody, kde působí toxicky na živé organismy (Rickert a kol., 1984; Popp a kol., 1983; Dodard a kol., 1999). Přestože znečištění vody a půd výbušninami se věnuje velká pozornost již několik desetiletí, role DNT jako kontaminantu je opomíjena a jeho degradace byla popsána pouze u živočichů a mikroorganismů. Schopnost rostlin odbourávat 2,4-DNT z media byla prokázána na *in vitro* kulturách starčku. Experiment trval 25 dní a za tuto dobu klesla koncentrace DNT ze 100 mg.dm^{-3} na 20 mg.dm^{-3} . Poměrně velká odchylka byla dána různou velikostí pokusných rostlin. K určení degradačních produktů byla použita suspenzní kultura mydlice lékařské. DNT v počáteční koncentraci 50 mg.dm^{-3}

bylo absorbováno do buněk, po 1 hod bylo obsaženo v mediu v minimálním množství, buňkách byl obsah DNT nejvyšší (450 mg.g⁻¹sušiny) již 15 minut po jeho aplikaci. DNT je degradovatelný mikroorganismy jak oxidační cestou, která vede k rozštěpení aromatického kruhu, tak redukční cestou za vzniku aminonitrotoluenů (4-ANT a 2-ANT) a diaminonitrotolueny (DAT) (Mc Cormick a kol., 1978; Nogura Freedman, 1996). Ačkoliv aminonitrotolueny vznikají za anaerobních i aerobních podmínek, další redukce na DAT byla popsána pouze za podmínek metanogenních. (Berchtold a kol., 1995). Podle předpokladu stejně jako u mikroorganismů došlo v rostlinných buňkách k redukcí nitrosloučeny a jako meziproducty degradace byly identifikovány v mediu 4-ANT a 2-ANT. Po celou dobu experimentu převažovala koncentrace 4-ANT v porovnání s 2-ANT a to téměř desetinásobně. Přítomnost v rostlinných buňkách byla prokázána jen u 4-ANT (*Graf 13.-15.*).

5.2.3 Nitroestery

Na rozdíl od aromatických nitrosloučenin nepůsobí trinitroglycerin (TNG) zdaleka tak toxicky, a proto byl pro rostlinné degradace používán ve vyšších koncentracích, až 600 mg.dm⁻³. Výběr sítiny souvisel se současně probíhajícími experimenty *in situ* při čištění odpadní vody po výrobě nitroglycerinu. Rostliny kultivované *in vitro* odbouraly během 24 h více jak 50 % původního množství TNG. V mediu byly detekovány v malém množství degradační produkty 1,2-DNG a 1,3-DNG, jejich koncentrace v mediu se zvyšovala až do 13. dne, po uplynutí této doby pomalu začala klesat. Další hydrolyza vedla k tvorbě mononitroglycerinu, který byl identifikován v mediu 8.den, jeho množství prudce stoupalo až do ukončení pokusu. Podobný průběh odbourávání TNG bylo možné sledovat u suspenzní kultury lnu. Při počáteční koncentraci 300mg.dm⁻³ byl odbourán z media veškerý TNG během 24 hod., v mediu byly identifikovány oba produkty degradace s převahou 1,2-DNG (až 4x). V buněčném extraktu byla pozorována absorpce TNG do buněk a jeho následné odbourávání, degradační produkty nebyly nalezeny, pravděpodobně jejich množství bylo pod hranicí detekovatelnosti na HPLC. Způsob degradace TNG vyššími rostlinami odpovídá v literatuře popsaném metabolismu TNG mikroorganismy a houbami.(White a kol., 1996; Christodoulatos a kol., 1997)

5.3 TOXICITA NITROLÁTEK A JEJICH DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ

Sledování rostlinného metabolismu nitrosloučenin a nitroesterů vyvolává otázku toxicity nalezených produktů a meziproduktů degradace s ohledem na možnosti další kontaminace životního prostředí či vstupu toxických látek do potravinového řetězce. Toxické působení na živé systémy může být sledováno pomocí řady ekotoxikologických testů. Velmi rozšířené jsou testy na jednoduchých organismech jako jsou prvoci, bičíkovci, bakterie, sinice, řasy. U vyšších rostlin se používají klíčící rostliny. Test použitý v této práci je založen na inhibici klíčení a růstu primárního kořene hořčice bílé,

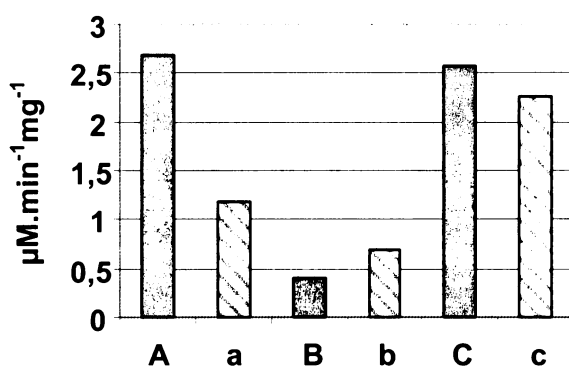
Fytotoxicitou TNT se zabývala řada autorů, z jejich výsledků je patrné, že citlivost k TNT je velice druhově specifická, závislá též na typu půdy a růstovém stadiu rostliny. Použití ekotoxikologického testu však umožnilo porovnat toxicitu výchozí látky s degradačními produkty. Z výsledků je patrné, že snížení počtu nitroskupin ze 3 na 2 vedlo k snížení toxicity, přibližně o 30%, přičemž další snížení o 1 nitroskupinu však k poklesu toxicity nevedlo. Velmi toxickým se ukázal TNB, jehož IC_{50} se pohybovalo kolem $10\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. (IC_{50} TNT = $40\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, IC_{50} ADNT = $60\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, IC_{50} DANT = $45\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) (Graf 20. – 25.).

Toxicitu 2,4-DNT testoval Dodard na vířnících (*Vibrio fischeri*) a řasách (*Selenastrum capricornutum*) s rozdílnými výsledky, což dokazuje nejednotnost detoxikačních procesů u různých organismů. Pro vířníky byl nejtoxičtější 4-ANT, následovaly pak v řadě 2-ANT, 2,4-DNT, 2,4-DAT. Pro řasy však byl výrazně toxický 2,4-DNT, degradační produkty už méně (Dodard a kol., 1999). Pro ekotoxikologické testy na klíčících rostlinách hořčice byla vybrána nejvyšší koncentrace $200\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, která koresponduje s nejvyšší možnou rozpustností DNT ve vodě. V této koncentraci je DNT i produkty nitroredukce velmi toxické (inhibice > 90 %) s výjimkou DAT, který v této koncentraci dosahoval pouze 60 % inhibici. Dle našich výsledků, je fytotoxicita DNT srovnatelná s TNT, aminonitrotolueny jsou však toxičtější než nitrodiaminotolueny či diaminonitrotolueny (Graf 26.-29.).

Další skupinou látek jejichž toxicitu jsme stanovovali, byly estery kyseliny dusičné. Rozpustnost těchto látek ve vodě je velmi dobrá, a proto se koncentrační řada pohybovala v rozmezí 0 - $400\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. 50 % inhibice bylo dosaženo u TNG při koncentraci $150\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, u směsi DNG při $200\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, zatímco u MNG až při $400\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Graf 30.-32.).

5.4 IZOLACE ENZYMU S NITROREDUKTASOVOU AKTIVITOU

Jedním ze stěžejních cílů této práce byla izolace a identifikace enzymu zodpovědného za redukci nitroskupin TNT za vzniku aminonitrotoluenů. Protože jsme předpokládali, že jeho obsah v suspenzní kultuře nebude příliš vysoký, a tak prvotním záměrem bylo zvýšení jeho exprese vystavením rostlinných buněk kontaminantu. K pokusům byla použita suspenzní kultura mydlice lékařské, která vykazovala vysokou toleranci vůči toxickým účinkům TNT. Buňky byly vystaveny účinkům TNT (resp. 4-ADNT) 9 hod. Nitroreduktásová aktivita byla testována u hrubého extraktu rozděleného na dvě frakce vysrážením síranem amonným do 40 % a 80 % saturace. Test probíhal za aerobních i anaerobních podmínek, v přítomnosti kofaktoru (NADH) i bez kofaktoru, jako substrát bylo použito jak TNT, tak 4-ADNT. Vyšší aktivita byla naměřena u 40-80 % síranové frakce, aktivitu zvyšovala přítomnost NADH a katalasy zejména za anaerobních podmínek. Buňky indukované TNT v této frakci vykazovaly nižší aktivitu než buňky aktivované 4-ANT. Nejvyšší aktivita byla překvapivě zjištěna u kontrolní skupiny buněk, a to i v případě frakce vysrážené síranem amonným do 40 % saturace. Oproti předcházející frakci, enzymy této frakce lépe využívaly jako substrát 4-ADNT bez ohledu na indukci. Indukce nebylo dosaženo ani při prodloužení doby expozice na 4 dny (Podlipná a kol., 2006), ani při použití kalusové kultury *Arabidopsis thaliana* (Graf 50).



Graf 50. Specifická aktivita hrubého extraktu a síranových frakcí získaných z kalusové kultury *Arabidopsis thaliana*

a, A hrubý extrakt

b, B frakce vysrážená síranem do 35 % saturace

c, C frakce vysrážená síranem od 35 % do 70 % saturace

malá písmena = ošetřeno TNT (30 mg.dm⁻³) 2h před izolací

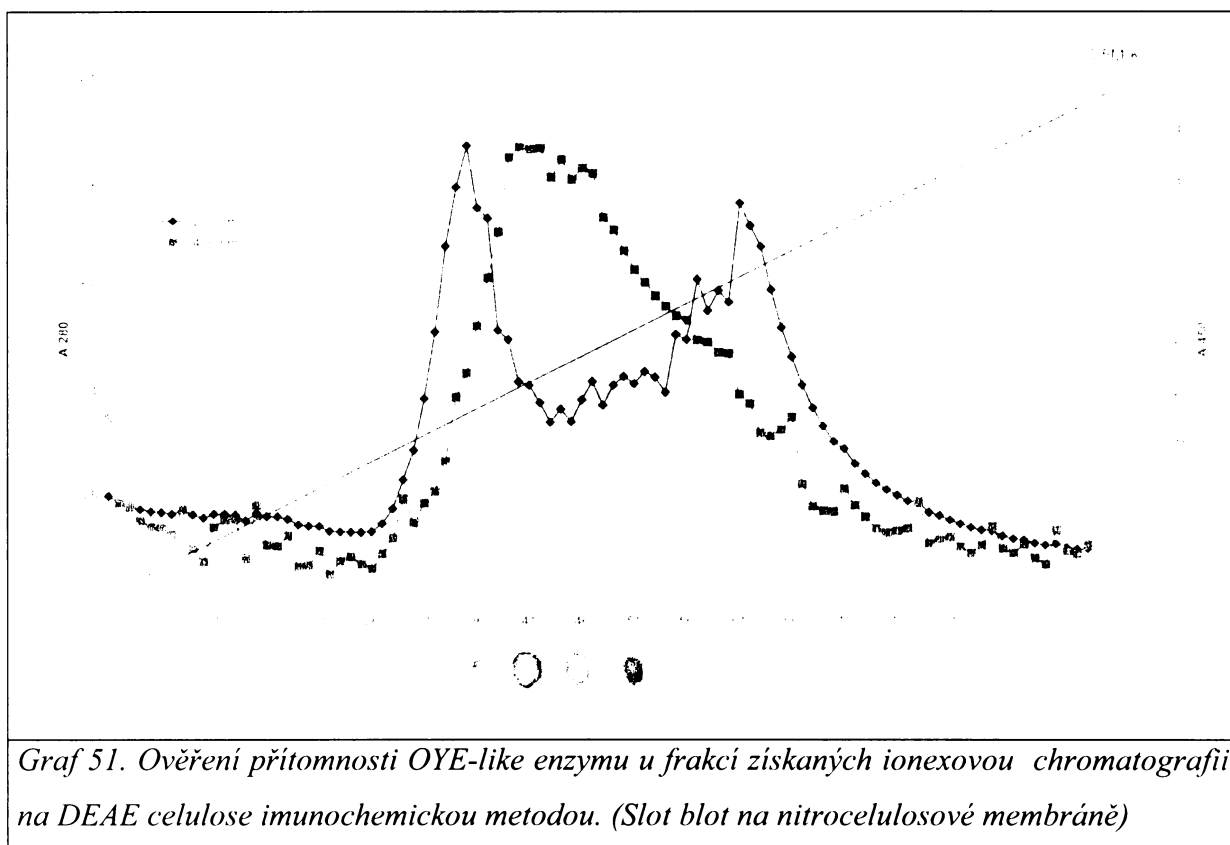
Nitroreduktázová aktivita v hrubém extraktu byla testována i pro další substráty. Hrubý extrakt velmi účinně degradoval TNB, naopak nereagoval ani s jedním z izomerů diaminonitrotoluenů (*Graf 33.- 37.*).

K samotné izolaci byla použita frakce vzniklá z hrubého extraktu precipitací síranem amonným od 40 % do 80 % saturace. Tato frakce vykazovala jak vyšší obsah bílkovin ($1,16\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), tak vyšší nitroreduktázovou aktivitu než frakce 0 – 40 %. Jako další kroky izolace byly postupně za sebou zvoleny ionexová sloupcová chromatografie na DEAE celulóse, gelová chromatografie a ionexová chromatografie na koloně Mono Q. Mezi jednotlivými kroky byl u získaných frakcí testován obsah bílkovin v porovnání s nitroreduktázovou aktivitou (*Graf 38.-41.*). Postupnou separací tak byla nalezena frakce ve které převažoval dle SDS-PAGE elektroforesy enzym s molekulovou hmotností kolem 29 kD (*Obr.33.*). Hledaný enzym katalyzuje první krok degradace TNT, který vede k vytvoření nitroso a/ nebo hydroxylamino –derivátů. Tyto látky jsou velmi nestabilní a za anaerobních podmínek vytvářejí Meseinheimerův komplex nebo semichinony.(Vorberck a kol., 1994, Strassner a kol. 1999). Jsou to látky barevné, a proto jsme předpokládali, že nám pomohou detekovat hledaný enzym. K nalezení požadovaného enzymu s nitroreduktázovou aktivitou byl proto použit nový přístup, kdy byla provedena nativní elektroforesa vybraných frakcí, a gel byl dále převrstven reakční směsí, obsahující TNT. Inkubace probíhala v anaerobním prostředí a po uplynutí 1 hodiny byly na gelu patrný žlutooranžová skvrny. Nejintenzivnější zabarvení se objevilo u sloučené frakce 46-60 po ionexové chromatografii na DEAE celulóse, v menší míře pak u vzorku po ionexové chromatografii na koloně Mono Q, z čehož vyplývá, že posledních dvou krocích došlo k poměrně velké ztrátě enzymu, a bude nutno příště upravit podmínky izolace (*Obr. 34.*).

Klasifikace enzymu byla určena podle sekvence 17 terminálních aminokyselin na sekvenátoru využívajícím Edmanovo odbourávání. Nalezená sekvence SSGVDVAEFSPRRLLT byla srovnávána se známými proteiny v proteinové databázi (Blast Protein Data Bank). Nalezená sekvence vykazovala 66,7 % homologii se sekvencí SNGIDIAHFTRPRRL náležející k 12-oxophytodienoat reductase (OPR1) izolované z *Arabidopsis thaliana* (Biesgen a Weiler, 1999) a 60 % homologii se sekvencí SNGIDIAHFTRPRRL z rajčete (*Lycopersicon esculentum*) (Breithaupt a kol., 2001). OPR1 náleží ke skupině Old Yellow Enzyme (OYE, EC. 1.6.99.1)-flavoproteinu, který má jako prostetickou skupinu FMN a byl prvně izolován Theorellem v roce 1935 z kvasinek (Theorell a kol., 1935).

Pro určení dalších charakteristik OYE-like enzymu jako např. substrátová specifita bude nutné izolovat enzymu větší množství. Ke zjednodušení detekce enzymu v jednotlivých krocích izolace jsme si nechali firmou SEVAPHARMA připravit protilátky. Efektivnost použití imunochemické metody je patrna na *Grafu 51*. Pomocí této metody bude také možné vyhledávat podobné enzymy u jiných rostlinných druhů a ověřovat jejich funkci v metabolismu xenobiotik.

Dalším krokem pak bude nalezení příslušných genů a příprava transgenních rostlin se zvýšenou schopností degradace nitroláték.



Graf 51. Ověření přítomnosti OYE-like enzymu u frakcí získaných ionexovou chromatografií na DEAE celuloze imunochemickou metodou. (Slot blot na nitrocelulosové membráně)

5.5 FYTOREMEDIACE NITROESTERŮ *IN SITU*

K ověření výsledků laboratorní práce v praxi se nám naskytla příležitost ve spolupráci s firmou zabývající se výrobou výbušnin nitroesterového typu. Na jejím území byly počátkem června 2004 postaveny modelové čistírny odpadní vody, které sloužily k ověření možnosti odbourávání nitroesterů z odpadní vody a zároveň k porovnání fytořadiační účinnosti

různých druhů mokřadních rostlin (*Obr. 38.*). K pokusům byly vybrány druhy hojně se vyskytující v přirozených mokřadních společenstvech v blízkém okolí. První rok sloužil především k optimalizaci provozu čistíren po technické stránce. Zakoupené rostliny bylo potřeba nechat poměrně dlouho zakořenit, než mohly být pilotní experimenty zahájeny. Problémem se ukázalo přílišné znečištění odpadní vody, která obsahovala nitroestery v koncentraci až $2,5 \text{ g.dm}^{-3}$ a dusičnany $28,5 \text{ g.dm}^{-3}$. Odpadní voda se také lišila v hodnotách pH, v určité fázi výroby byla vypouštěna odpadní voda o pH 1,2. V roce 2004 byl proto uskutečněn pouze jeden experiment, kdy naředěním odpadní vody byla získána voda s koncentrací nitroesterů 300 mg.dm^{-3} . Odbourání nitroesterů pod hranici detekovatelnosti bylo dosaženo do 3 týdnů, čímž byla ověřena funkčnost systému (*Graf 45.*).

V dalším roce (2005) bylo důsledně kontrolováno pH u zásobní odpadní vody, voda pro vstup do experimentů byla naředěna tak, aby se vstupní koncentrace nitroesterů pohybovala v rozmezí $200\text{-}500 \text{ mg.dm}^{-3}$ a množství dusičnanů nepřesáhlo 5 g.dm^{-3} . V těchto podmínkách byl růst rostlin uspokojivý a bylo možno postupně zvyšovat vstupní koncentraci nitroesterů až na 600 mg.dm^{-3} . Doba odbourávání se zkrátila na 9-15 dní. Ve srovnání efektivnosti jednotlivých druhů vyšla nejhůře sítina (*Graf 46.-47.*). Přestože vykazovala velmi dobré růstové vlastnosti, její využití pro fytořediační účely je diskutabilní. Funkce této modelové čistírny byla plně uspokojivá, a v dalších letech by mohla být použita k testování různých rostlinných druhů s ohledem na schopnost fytořediace.

Na základě pozitivních výsledků dosažených u modelové čistírny, jsme v roce 2005 přistoupili ke konstrukci větší kořenové čistírny ve formě mokřadu. Problémem se ukázal velmi pomalý nárůst nových rostlin zejména rákosí a orobince, proto předpokládáme pro letošní rok (2006) výrazné zvýšení efektivnosti čistírny. Další zlepšení by přinesl jiný způsob míchání, které by mělo být kontinuální. U nově vytvořeného mokřadu bude nutný delší čas (1-2 roky) k nárůstu biomasy potřebné k efektivní činnosti čistírny, přesto již v 1. roce své existence byl zjištěn určitý stupeň dekontaminace (*Tab.22.*). Závažným problémem se jeví nedostatečná cirkulace vody.

6 Závěry

- ❖ Degradace TNT může probíhat v různých kultivačních systémech. Byly nalezeny a určeny degradační produkty TNT u slunečnic ročních (*Helianthus annuus*) pěstovaných v hydroponickém systému, u *in vitro* tkáňových kultur topolu černého (*Populus nigra*) a hybridu topol osika (*Populus tremula x tremuloides*), u suspenzních buněčných kultur mydlice lékařské (*Saponaria officinalis*) a konopí setého (*Linum usitatissimum*). Rychlost degradace a množství degradačních produktů bylo závislé na použitém systému, rostlinném druhu a vstupní koncentraci TNT.
- ❖ V dalším kroku byl sledován metabolismus nalezených degradačních produktů (ADNT, DANT, TNB, DNA). Po prvé byl pozorován při degradaci TNB vznik DNA, v literatuře dosud pouze předpokládaného meziprojektu.
- ❖ Sledováním distribuce radioaktivity v rostlinách při použití ¹⁴C-TNT bylo zjištěno, že až 80 % TNT se degraduje již v kořenech, přičemž více jak polovina vzniklých látek je pak pevně zabudována do buněčné stěny.
- ❖ DNT jako prekurzor při výrobě TNT často doprovází kontaminaci půdy a vody tímto xenobiotikem. V této práci byla po prvé popsána možnost degradace DNT vyššími rostlinami a určeny hlavní degradační produkty (4-ANT, 2-ANT). K experimentům byla použita *in vitro* kultura regenerantů starčku (*Senecio jacobaea*) a suspenzní buněčná kultura mydlice lékařské (*Saponaria officinalis*).
- ❖ Pomocí testu inhibice růstu primárního kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*) byla porovnána fytotoxicita TNT, DNT, TNG a jejich degradačních produktů. Produkty degradace TNT, jsou až na výjimku TNB méně toxické než původní kontaminant. TNB je výrazně toxickejší i v nízkých koncentracích. Produkty první redukce DNT jsou mírně toxickejší než výchozí látka, další redukce však toxicitu výrazně snižuje. Nitroestery jsou podstatně méně toxické než nitrosloučeniny, TNG a DNG způsobují 50 % inhibici růstu kořene až při koncentraci nad 200 mg.dm⁻³. Nejméně toxickejší je MNG.

- ❖ Proces degradace nitrosloúčenin začíná redukcí nitroskupiny. V suspenzní kultuře mydlice lékářské byl nalezen a izolován enzym zodpovědný za tuto reakci. Jedná se o flavoprotein vykazující 66,7 % podobnost s OPR1 (12-oxophytodienoat reduktasa izolovaná z *Arabidopsis thaliana*) a tedy náležející do skupiny Old Yellow Enzyme (OYE, EC. 1.6.99.1). Jeho molekulová hmotnost byla stanovena na 29,3 kDa. Indukce přítomností TNT nebyla prokázána.
- ❖ Možnost využití rostlin pro čištění odpadních vod, vzniklých při výrobě výbušnin nitroesterového typu, byla ověřena v modelové čistírně na čtyřech druzích mokřadních rostlin -*Typha laxmanii* (orobinec sítinovitý), *Juncus inflexus* (sítina sivá), *Phragmites australis* (rákos australský) a *Iris pseudocorus* (kosatec žlutý). Při vhodně zvolené vstupní koncentraci nitrosterů (do 500 mg.dm⁻³), byly tyto látky odstraněny z odpadní vody v několika dnech. Nejméně účinná byla sítina. Na základě těchto výsledků byla zkonstruována a dána do provozu zkušební kořenová čistírna odpadních vod v areálu společnosti zabývající se výrobou výbušnin.

7 Použitá literatura

- Accashian, J.V., Vinopal, R.T., Kim, B.-J., Smets, B.F. (1998) Aerobic growth on nitroglycerin as the sole carbon, nitrogen, and energy source by a mixed bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (9), pp. 3300-3304
- Akrill, P., Guiver, R., Cocker, J. (2002) Biological monitoring of nitroglycerin exposure by urine analysis. *Toxicology Letters* 134 (1-3), pp. 271-276
- Alkorta, I., Garbisu, C. (2001) Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* 79 (3), pp. 273-276
- Anderson, C.W.N., Brooks, R.R., Chiarucci, A., LaCoste, C.J., Leblanc, M., Robinson, B.H., Simcock, R., Stewart, R.B.: (1999): Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* 67, Iss.1-3, 407
- Andrews, C.J., Jepson, I., Skipsey, M., Townson, J.K., Edwards, R. (1997): Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. *Pestic. Sci.* 51: 213 – 222
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126
- Baker, AJM; McGrath, SP; Sidoli, CMD; Reeves, RD. 1994. The possibility of in-situ heavy-metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources Conservation And Recycling* 11 (1-4): 41-49.)
- Baumgartner, D.J., Glen, E.P., Kuehl, R.O., Thompson, T.L., Artiola, J.F., Menke, S.E., Saar, R.A., Moss, G.S. and Algharaibeh, M.A. (2000) Plant uptake response to metals and nitrate in simulated uranium mill tailings contaminated groundwater. *Water, Air and Soil Pollution* 118, 115-129
- Best, E. P. H., Sprecher, S. L., Larson, S. L., Fredrickson, H. L., and Bader, D. F. (1999a) Environmental behavior of explosives in groundwater from the Milan Army Ammunition Plant in aquatic and wetland plant treatments. Uptake and fate of TNT and RDX in plants. *Chemosphere* 39:2057–2072.
- Best, E. P. H., Sprecher, S. L., Larson, S. L., Fredrickson, H. L., and Bader, D. F. (1999b). Environmental behavior of explosives in groundwater from the Milan army ammunition plant in aquatic and wetland plant treatments. Removal, mass balances and fate in groundwater of TNT and RDX. *Chemosphere* 38:3383–3396.
- Best, E. P. H., Zappi, M. E., Fredrickson, H. L., Sprecher, S. L., Larson, S. L., and Ochman, M. (1997) Screening of aquatic and wetland plant species for phytoremediation of explosives-contaminated groundwater from the Iowa Army Ammunition Plant. *Ann. NY Acad. Sci.* 829:179–194.
- Betts, K. S. 1998 A new 'green' building on campus. *Environmental Science and Technology* 32 (17), pp. 412A-414A

- Bhadra R., Spangord, R.J., Wayment, D.G., Hughes, J.B., Shanks, J.V. (1999a): Charakterization of oxidation products of TNT metabolism in aquatic phytoremediation systems of *Myriophyllum aquaticum*, *Environ Sci Technol* 33, 3354-3361
- Bhadra, R., Spangord, R.J., Wayment, D.G., Hughes, J.B., Shanks, J.V., (1999b) Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3354-61.
- Bhadra, R., Wayment, D. G., Williams, R. K., Barman, S. N., Stone, M. B., Hughes, J. B., and Shanks, J. V. (2001) Studies on plant-mediated fate of the explosives RDX and HMX. *Chemosphere* 44:1259–1264.
- Biesgen, C. & Weiler, E.W. (1999) Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 208, 155–165.
- Binks, P.R., French, C.E., Nicklin, S., Bruce, N.C. (1996) Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (4), pp. 1214-1219
- Binks, P.R., Nicklin, S., Bruce, N.C., (1995) Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4), 1318–1322.
- Blake-Kalf, M.M.A., Randall, R.A., Coleman, J.O.D. (1997) Compartmentation of Detoxified Xenobiotics in Plant Cells. In Hatzios, K.K. (1997) Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants, published by Kluwer Academic Publishers, The Neatherlands
- Blehert, D. S., B. G. Fox, and G. H. Chambliss. (1999) Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases, *Journal of Bacteriology* 181, 6254-6263.
- Boominathan, R., Doran, P. M. (2003): Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.83, Iss.2, 158
- Boyajian, G.E., Carreira, L.H. (1997) Phytoremediation: a clean transition from laboratory to marketplace? *Nat. Biotechnol.* 15, 127-128
- Bradford, M., M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), pp. 248-254
- Brooks, R.R. (1977) Copper and cobalt uptake by *Haumaniastrum species*. *Plant and Soil* 48, 541-544.

- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., Jaffre, T. (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* 7 (1), pp. 49-57
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M. (1995) Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils *Environmental Science and Technology* 29 (6), pp. 1581-1585
- Bruns-Nagel, D., Schmidt, T.C., Drzyzga, O., von Low, E., Steinbach, K., (1999). Identification of oxidized TNT metabolites in soil samples of a former ammunition plant. *Environ. Sci. Poll. Res.* 6 (1), 7–10.
- Bryant, C., DeLuca, M. (1990): Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* 266: 4119 – 4125
- Bryant, C., Mc Elroy, W. D. (1991): Nitroreductases. *In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes.* F. Muller, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 291 - 304
- Burken, J. G., Shanks, J. V., Thompson, P. L. (2000): Phytoremediation and plant metabolism of explosives and nitroaromatic compounds. *In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives.* Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, pp: 239 – 275
- Cattaneo, M.V., Masson, C., Hawari, J., Sunahara, G., Greer, C.W., Thiboutot, S., Ampleman, G., (1997). Natural attenuation of TNT in soil columns. *In: Alleman, B.C., Leeson, A. (Eds.), In situ and On-Site Bioremediation,* Battelle Press, Columbus, OH, pp. 3–8.
- Clemente Rafael, Walker David J., Roig Asunción, Bernal M.Pilar (2003): Heavy metal bioavailability in a soil affected by mineral sulphides contamination following the mine spillage at Aznalcóllar (Spain) *Biodegradation* Vol.14, Iss.3, 199
- Cobbett, Ch. S. and Meagher, R.B. (2002): Arabidopsis and Genetic Potential for the Phytoremediation of Toxic Elemental and Organic Pollutants, *In: The Arabidopsis Book*, Print ISSN: 1543-8120, The American Society of Plant Biologists
- Coleman, JOD; Frova, C; Schroder, P; Tissut, M. (2002) Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of persistent herbicides. *Environmental science and pollution research* 9 (1): 18-28.
- Collin, H. A., Edwards, S. (1998): Plant cell culture. Bios Scientific Publisher Ltd., UK
- Collins, C; Laturmus, F; Nepovim, A. 2002. Remediation of BTEX and trichloroethene - Current knowledge with special emphasis on phytoremediation. *Environmental science and pollution research* 9 (1): 86-94.
- Coughtrey, P.J., Kirton, J.A. and Mitchell, N.G. (1989) Transfer of radioactive caesium from soil to vegetation and comparison with potassium in upland grasslands. *Environmental Pollution* 62, 281-315

- Cummins, I., Moss, S., Cole, D.J., Edwards, R. (1997) Glutathione transferases in herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*) *Pesticide Science* 51 (3), pp. 244-250
- Cunningham, S.D., Berti, W.R. and Huang, J.W. (1995) Phytoremediation of contaminated soils. *TIBTECH* 13, 393-397
- Cunningham, S.D., Ow, D.W. (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 719
- Davis, LC; Castro-Diaz, S; Zhang, QZ; Erickson, LE. (2002) Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Critical reviews in plant sciences* 21 (5): 457-491.
- Dilley, J. V., Tyson, C. A., Spanggord, R. J., Chang, Y. X., Jiang, Q. G. (1982): Short-term oral toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in mice, rats and dogs. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 565 - 585
- Dodard S.G., A.Y. Renoux, J. Hawari, G. Ampleman, S. Thiboutot, G.I. Sunahara, (1999) Ecotoxicity characterization of dinitrotoluenes and some of their reduced metabolites, *Chemosphere* 38 2071–2079.
- Doty, S.L., Shang, T.Q., Wilson, A.M., Tangen, J., Westergreen, A.D., Newman, L.A., Strand, S.E., Gordon, M.P. (2000) Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12), pp. 6287-6291
- Duque, E., Haidour, A., Godoy, F., Ramos, J.L., (1993) Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6- trinitrotoluene. *J. Bacteriol.* 175 (8), 2278–2283.
- Durst, F., Benveniste, I., Lesot, A., Salaün, J. P., Werk-Reichhart, D. (1997): Induction of plant cytochrome P450. *In: Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, K.K. Hatzios, ed Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 19 – 34
- Dushenkov, S., Vasudev, D., Kapulnik, Y., Gleba, D., Fleisher, D., Ting, K.C. and Ensley, B. (1997) Removal of Uranium from Water Using Terrestrial Plants. *Environmental Science and Technology* 31, 3468-3474
- Dushenkov, S; Mikheev, A; Prokhnevsky, A; Ruchko, M; Sorochinsky, B. (1999) Phytoremediation of radiocesium-contaminated soil in the vicinity of Chernobyl, Ukraine. *Environmental Science and Technology* 33 (3): 469-475.
- Eapen, S., Suseelan, K.N., Tivarekar, S., Kotwal, S.A., Mitra, R. (2003) Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environmental Research* 91 (2), pp. 127-133
- Ederer, M.M., Lewis, T.A., Crawford, R.L. (1997) 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: Comparison with non-adapted bacteria *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18 (2-3), pp. 82-88

- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health *Trends in Plant Science* 5 (5), pp. 193-198
- Entry, J.A. and Emmingham, W.H. (1995) Sequestration of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr from soil by seedlings of *Eucalyptus tereticornis*. *Canadian Journal of Forest Research* 25, 1044-1047
- Entry, J.A., Rygiewicz, P.T. and Emmingham, W.H. (1993) Accumulation of cesium-137 and Sr-90 in ponderosa pine and monterey pine-seedlings. *Journal of Environmental Quality* 22, 742-746
- Fellows, R. J., Harvey, S.D., and Cataldo, D.A. (1992) An evaluation of the environmental fate and behaviour of munitions material (tetryl and polar metabolites of TNT) in soil and plant systems. Richland, Washington: Pacific Northwest Laboratories.
- French, C. E., S. J. Rosser, G. J. Davies, S. Nicklin, and N. C. Bruce. (1999). Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase, *Nature Biotechnology*, 17, 491-494.
- Fry, S. (1986): Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 165 – 186
- Fuchs, J.S., Oneto, M.L., Casabe, N.B., Gomez, S.O., Tarulla, R., Vaccarezza, M., Sanchez-Rivas, C., Kesten, E.M., Wood, E.J., (2001) Ecotoxicological characterization of a disposal lagoon from a munition plant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (5), 696–703.
- Funk, S.B., Roberts, D.J., Crawford, D.L., Crawford, R.L., (1993) Initialphase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (7), 2171–2177.
- Gilbert, E. (1980) Reaction of ozone with trans-trans muconic acid in aqueous solution. *Water Research* 14 (11), pp. 1637-1643
- Glick, B.R. (2003) Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment, *Biotechnology Advances*, 21 (5), Pages 383-393.
- Goel, A., G. Kumar, G. F. Payne, and S. K. Dube. (1997) Plant cell biodegradation of a xenobiotic nitrate ester, nitroglycerin, *Nature Biotechnology*, 15, 174-177.
- Gong, P., Siciliano, S. D., Greer, C. W., Paquet, L., Hawari, J., and Sunahara, G. I. (1999a) Effects and bioavailability of 2,4,6-trinitrotoluene in spiked and field-contaminated soils to indigenous microorganisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2681–2688.
- Gong, P., Wilke, B. M., and Fleischmann, S. (1999b). Soilbased phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. *Arch. Environ. Contam., Toxicol.* 36:152–157.
- Gordon, L., Hartley, W. R. (1992): 2,4,6-Trinitrotoluene. *In: Drinking Water Health Advisor: Munitions*. Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, pp. 327 – 398

- Gunse, B., Elstner, E. F. (1992): Formation of activated states of indole-acetic acid and cytokinins – an experimental approach to a hypothesis concerning signal transduction. *J. Plant Physiol.* 140: 536 – 540
- Haderlein, S.B., Schwarzenbach, R.P., (1995) Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitroaromatic compounds in the subsurface. In: Spain, J.C., (Ed.), *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*, Plenum Press, New York, pp. 199–225.
- Hakonson-Hayes A.C., Fresquez P.R., Whicker F.W. (2002): Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *Journal of Environmental Radioactivity* 59, 29
- Hannink, NK; Rosser, SJ; Bruce, NC. (2002) Phytoremediation of explosives. *Critical reviews in plant sciences* 21 (5): 511-538.
- Harms, H.H.: (1992) In-vitro systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pestic. Sci.* 35, 277-281
- Harvey, PJ; Campanella, BF; Castro, PML; Harms, H; Lichtfouse, E; Schaffner, AR; Smrcek, S; Werck-Reichharts, D. (2002) Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental science and pollution research* 9 (1): 29-47.
- Harvey, S., R. J. Fellows, D. A. Cataldo, R. M. J. Bean. (1990) Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its transformation products in soils and plant tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 518: 361-374.
- Hatzios, K., Penner, D. (1982): *Metabolism of Herbicides in Higher Plants*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, pp. 43 – 57
- Hatzios, K.K.(1997) *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants* published by Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Haythorn, S. R. (1920) Experimental trinitrotoluene poisoning. *J. Ind. Hyg.* 2:298.
- Hirata, T., Ashida, Y., Mori, H., Yoshinaga, D., Goad, L.J. (2000) A 37-kDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress. *Phytochemistry* 55 (3), pp. 197-202
- Hoagland, D.R. (1920) Optimum nutrient solutions for plants. *Science* 52, 562-564
- Homma-Takeda, S., Hiraku, Y., Ohkuma, Y., Oikawa, S., Murata, M., Ogawa, K., Iwamuro, T., Li, S., Fan Sun, G., Kumagai, Y., Shimojo, N., Kawanishi, S. (2002): 2,4,6-Trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite. *Free Radical Research.* 36 (5): 555 - 566
- Honeycutt, M. E., Jarvis, A. S., and McFarland, V. A. (1996) Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 35, 282-287
- Hughes, J. B., Shanks, J., Vanderford, M., Lauritzen, J., and Bhadra, R. (1997) Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ. Sci. Technol.* 31:266–271.
- Cheng, S., Grosse, W., Karrenbrock, F., Thoennessen, M. (2002) Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals *Ecological Engineering* 18 (3), pp. 317-325

- Cherian, S., Oliveira, M.M. (2005) Transgenic plants in phytoremediation: Recent advances and new possibilities *Environmental Science and Technology* 39 (24), pp. 9377-9390
- Christodoulatos, Ch., Bhaumik, S., Brodman, B. W. (1997) Anaerobic biodegradation of nitroglycerin. *Water Research* Vol.31, No.6, pp. 1462-1470
- Johnson, D.L., Maguire, K.L., Anderson, D.R., McGrath, S.P. (2004) Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: The impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology and Biochemistry* 36 (1), pp. 33-38
- Johnson, G.R., Smets, B.F., Spain, J.C. (2001) Oxidative Transformation of Aminodinitrotoluene Isomers by Multicomponent Dioxygenases. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12), pp. 5460-5466
- Jones, P., Vogt, T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213 (2), pp. 164-174
- Khan, H.; Harris, R.J.; Barna, T.; Craig, D. H.; Bruce, N. C.; Munro, A. W.; Moody, P. C. E.; Scrutton, N. S. (2002) Kinetic and Struktural Basis of Reaktivty of Pentaerythritol Tetranitrate Reduktase with NADPH, 2-Cyclohexenone, Nitroesters, and Nitroaromatic Explosives. *The Journal of Biological Chemistry* vol.277, No.24, pp. 21906-21912
- Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G., Korte, F. (1997): Plat monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 36: 118 – 122
- Kinouchi, T. a Ohnishi, Y. (1983): Purification and charakterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 596 – 604
- Kohli, R. M. and Massey, V. (1998) The Oxidative Half-reaction of Old Yellow Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 273, No.49, pp. 32763-32770
- Krishnan, G., Horst, G. L., Darnell, S., Powers, W.L. (2000): Growth and development of smooth brome grass and tall fescue in TNT-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 107: 109 – 116
- L'Azou, B., Henge-Napoli, M.H., Minaro, L., Mirto, H., Barrouillet, M.P., Cambar, J. (2002): Effects of cadmium and uranium on some in vitro renal targets. *Cell Biology and Toxicity* Vol.18, Iss.5, 329
- Lagrimini, L. M. (1991): Wood induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96: 577 – 583
- Lachance, B., Robideux, P. Y., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Sunahara, G. I., (1999) Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro. *Mutat. Res.* 444, 25-39.
- Lamourex, G.L., Rusness, D.G., Schroeder, P., Rennenbert, H. (1991): Diphenyl ether herbicide metabolism in a spruce cell suspension culture: the identification of two novel metabolites derived from a glutathion conjugate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 39: 291 – 301
- Larcher, W.(2003): *Physiological Plant Ecology, Ecophysiology and stress Physiology*, ISBN 3-540-43516-6 Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York

- Larson, S. L., Jones, R. P., Escalon, L., Parker, D. (1999). Classification of explosives transformation products in plant tissue. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1270-1276.
- Levent Ozturk, Sema Karanlik, Faruk Ozkutlu, Ismail Cakmak, Kochian L. V.: (2003): Shoot biomass and zinc/cadmium uptake for hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species in response to growth on a zinc-deficient calcareous soil. *Plant Science* Vol. 164, Iss. 6, 1095
- Levine, B. S., Furedi, E. M., Gordon, D. E., Lish, P. M. a Barkley, J. J. (1984): Subchronic toxicity of trinitrotoluene in *Fischer 344* rats. *Toxikology* 32: 253 – 265
- Lewis, T. A.; Newcombe, D. A., Crawford, R. L. (2004) Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management* 70, pp.291-307
- Li, Z.S., Alfenito, M.R., Rea, P.A., Walbot, V., Dixon, R.A. (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathion conjugate pump, *Phytochemistry* 45, 689-693
- Liu, G., Sanchez-Fernandez, R., Li, Z. S., Rea, P. A. (2001): Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar multidrug resistance-associated protein type ATP-binding cassette transporter AtMRP2. *J. Biol. Chem.* 276: 8648 – 8656
- Lu, Y. P., Li, Z. S., Drozdowicz, Y. M., Hortensteiner, S., Martinoia, E., Rea, P. A. (1998): AtMRP2, *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter able to transport glutathione s-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparison with AtMRP1. *Plant Cell* 10: 267 - 282
- Lu, Y. P., Li, Z. S., Rea, P. A. (1997): AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione s-conjugate pumps: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Pro Natl Acad Sci USA* 97: 8243 – 8248
- Lucero, M. E., Mueller, W., Hubstenberger, J, Phillips, G.C., and O'Connell, M.A. (1999) Tolerance to Nitrogenous Explosives and Metabolism of TNT by Cell Suspensions of *Datura innoxia*. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 35:480–486.
- Mabey, w.R., Tse, D., Baraze, A., Mill, T. (1983) Reduction of nitroaromatic compounds in the subsurface, *Chemosphere* 12, 3-16
- McCormick, N. G., Cornell, J.H., and Kaplan, A.M. (1981). Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine. *Appl. Environ. Microb.* 42:817–823.
- McCutcheon, S. C., Schnoor, J. L. (eds.) (2003): Phytoremediation – Transformation and control of contaminants. Environmental science and technology, A Wiley-Interscience Series of Texts and Monographs, Hoboken, NJ
- Medina, V. F. and McCutcheon, S.C. (1996) Phytoremediation: modeling removal of TNT and its breakdown products. *Remediation* 6:31–45.
- Meng, M., Sun, W.-Q., Geelhaar, L.A., Kumar, G., Patel, A.R., Payne, G.F., Speedie, M.K., Stacy, J.R. (1995) Denitration of glycerol trinitrate by resting cells and cell extracts of *Bacillus*

- thuringiensis/cereus* and *Enterobacter agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (7), pp. 2548-2553
- Merck. (1983). The Merck Index. Rathway, New Jersey:
- Michels, J., Gottschalk, G., (1995) Pathway of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. In: Spain, J.C., (Ed.), Biodegradation of Nitroaromatic Compounds, Plenum Press, New York, pp. 134–149.
- Morikawa, H., Erkin, O.C. (2003) Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control. *Chemosphere* 52 (9), pp. 1553-1558
- Müller, M. (1983): Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 93: 165 – 171
- Murashige, T., Skoog, F., (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nepovím, A., Hebner, A., Soudek, P., Gerth, A., Thomas, H., Smrček, S., Vaněk, T. (2005) Phytoremediation of TNT by selected helophytes. *Chemosphere* 60, 1454 – 1461
- Nepovím, A., Hubálek, M., Podlipná, R., Zeman, S., Vaněk, T. (2004a) In-vitro degradation of 2,4,6-trinitrotoluene using plant tissue cultures of *Solanum aviculare* and *Rheum palmatum*. *Engineering in Life Sciences*, 4 [1] 46-49.
- Nepovím, A., Podlipná, R., Soudek, P., Schröder, P., Vaněk, T., (2004b) Effects of Heavy Metals and Nitroaromatic Compounds on Horseradish Glutathione S-Transferase and Peroxidase, *Chemosphere* 57, 1007-1015
- Nepovím, A., Zeman, S., Vaněk, T. (2000): Tkáňové kultury vyšších rostlin – model pro studium enzymatické degradace výbušnin. *Chemické listy* 94 (8): 746 – 747
- Nifontova, M.G., Kulikov, G.I., Tarshis, G.I. and Dyachenko, A.P. (1989) Radioecological study of natural ecosystems in the vicinity of atomic power-stations. *Soviet Journal of Ecology* 19, 155-160
- Nishino, S.F., Spain, J.C., Lenke, H., Knackmuss, h.-j. (1999): Mineralization of 2,4- and 2,6-Dinitrotoluene in Soil Slurries, *Environ. Sci. Technol.*, 33,1060-1064
- Oh, B. T., Sarath, P. J., Drijber, R. A., & Comfort, S. D. (2000). Rapid spectrophotometric determination of TNT in a *Pseudomonas* enzyme assay. *J. Microb. Methods*, 42, 149-158.
- Palazzo, A. J. and Leggett, D. C. (1986) Effect and Disposition of TNT in a Terrestrial Plant. *J. Environ. Qual.* 15:49–52.
- Pavlostathis, S. G., Comstock, K. K., Jacobson, M. E., Saunders, F. M. (1998): Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by the aquatic plant *Myriophyllum spicatum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2266-2273
- Pennington, J.C., Brannon, J.M. (2002) Environmental fate of explosives. *Thermochimica Acta* 384 (1-2), pp. 163-172

- Penttila, S., Kairesalo, T. and Uusi-Rauva, A. (1993) The occurrence and bioavailability of radioactive cs-137 in small forest lakes in southern finland. *Environmental Pollution* 82, 47-55
- Peterson, F.J., Mason, R. P., Hovsepian, J. a Holtzman, J. L. (1979): Oxygen-sensitive and insensitive nitroreduction by *E. coli* and rat hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.* 254: 4009-4014
- Peterson, M. M., Horst, G. L., Shea, P. J., and Comfort, S. D. (1998) Germination and seedling development of switchgrass and smooth bromegrass exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Environ. Pollut.* 99:53–59.
- Peterson, M.M., Horst, G. L., Shea, P. J., Comfort, S. D., Peterson, R. K. D. (1996): TNT and 4-amino-2,6-dinitrotoluene influence on germination and early seedling development of tall fescue. *Environ. Pollut.* 93 (1): 57 - 62
- Pflugmacher, S., Sandermann, H. (1998): Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 49: 507 – 511
- Pflugmacher, S., Schroeder, P., Sandermann, H. (2000): Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54: 267 – 273
- Pilon-Smits, E; Pilon, M. 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical reviews in plant sciences* 21 (5): 439-456.
- Pinder, J.E., McLeod, K.W., Alberts, J.J. and Adriano, D.C. (1984) Uptake of Cm-244, Pu-238 and other radionuclides by trees inhabiting a contaminated flood-plain. *Health Physics* 47, 375-384
- Podlipna, R., Nepovím, A., Vágner, M., Vaněk T., (2006) Soapwort oxophytodienoate reductase is involved in trinitrotoluene detoxification, *Biologia Plantarum* -accepted
- Punshon T., Gaines K.F., Jenkins Jr.R.A. (2003): Bioavailability and trophic transfer of sediment-bound Ni and U in a southeastern wetland system, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.44, Iss.1, 30
- Reifler, R.G. and Smets, B.F. (2002) NAD(P)H:FlavinMononucleotide Oxidoreductase Inactivation during 2,4,6-Trinitrotoluene Reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.68, No.4, p.1690-1696
- Reichhart, D. (1998): The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiol.* 118: 1049 – 1056
- Rickert D.E., B.E. Butterworth, J.A. Popp, (1984) Dinitrotoluene: acute toxicity, oncogenicity, genotoxicity, and metabolism. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 13 217–234.

- Rieble, S., Joshi, D.K., Gold, M.H. (1994) Aromatic nitroreductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205 (1), pp. 298-304
- Rivera, R., Medina, V. F., Larson, S. L., McCutcheon S. C. (1998): Phytoremediation of TNT contaminated groundwater. *J Soil Contam* 7, 511-529
- Rivera, R., V. F. Medina, S. L. Larson, and S. C. McCutcheon. (1998) Phytotreatment of TNT-contaminated groundwater, *Journal of Soil Contamination*, 7, 511-529.
- Ro, K.S., Venugopal, A., Adrian, D.D., Constant, D., Qaisi, K., Valsaraj, K.T., Thibodeaux, L.J., Roy D., (1996) Solubility of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in water. *J. Chem. Eng.* 41, 758-761.
- Rodgers, J.D., Bunce, N.J., (2001) Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Wat. Res.* 35, 2101-2111.
- Rosenblatt, D. H. (1980) Toxicology of explosives and propellants. *In: Encyclopedia of Explosives and Related Items*, S. M. Kaye, Ed., Dover, New Jersey: US Army Armament Research Development Committee.
- Rosenblatt, D. H., Burrows, S.P., Mitchell, W.R., and Parmer, D.L. (1991) Organic Explosives and Related Compounds. *In: The Handbook of Environmental Chemistry*. Hutzinger, O., Eds., Springer-Verlag, New York.
- Rossini, L., Jepson, I., Greenland, A.J., Gorla, M.S. (1996) Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor *Plant Physiology* 112 (4), pp. 1595-1600
- Sahi Shivendra V., Bryant Natalie L., Nilesh C., Singh Shree R. (2002) Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii* *Environmental Science and Technology* Vol.36, Iss.21, 4676
- Salt, C.A., Mayes, R.W. and Elston, D.A. (1992) Effects of season, grazing intensity and diet composition on the radiocesium intake by sheep on reseeded hill pasture. *Journal of Applied Ecology* 29, 378-387
- Salt, D. E., Smith, R. D., Raskin, I. (1998): Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643-668
- Salzer, P., Hager, A. (1993): Effect of auxing and ectomycorrhizal elicitors on wall bound proteins and enzymes of spruce (*Picea abies* (L) Karst) cell. *Trees-struct. Funct.* 8: 49 – 55
- Sandermann Jr., H. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*, 17 (2), Pages 82-84.

- Sangwan, R. S. and Gorenflot, R. *In vitro* culture of *Phragmites* tissue. Callus formation, organ differentiation and cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 75, 256-269
- Sens, C., Scheidemann, P., Klunk, A., Werner D., (1998) Distribution of ^{14}C -TNT and derivatives in different biochemical compartments of *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 4, 202-208.
- Schalk, M., Pierrel, M. A., Zimmerlin, A., Batard, Y., Durst, F., Werck- Reichhart, D. (1997): Xenobiotics: substrates and inhibitors of the plant P450s. *Environ. Sci. Polut. Res.* 4: 229 – 234
- Scheibner, K., Hofrichter, M., Herre, A., Michels, J., and Fritsche, W. (1997). Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 452-457.
- Scheidemann, P., A. Klunk, C. Sens, and D. Werner. (1998) Species dependent uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 152, 242-247.
- Schneider, K., Oltmanns, J., Radenberg, T., Schneider, T. and PaulyMundegar, D. (1996) Uptake of nitroaromatic compounds in plants — implications for risk assessment of ammunition sites. *Environ. Sci. Pollut. R.* 3:135–13
- Schrenk, C., Pflugmacher, S., Brüggemann, R., Sandermann, H., Steinberg, C.E.W., Kettrup, A. (1998): Glutathione S-transferase activity in aquatic macrophytes with emphasis on habitat dependence. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 40: 226 – 233
- Schroder, P; Collins, C. 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* 4 (4): 247-265.
- Schuller, M. A. (1996): Plant cytochrome P 450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 235 – 284
- Schulman, R.N., Salt, D.E., Raskin, I. (1999) Isolation and partial characterization of a lead-accumulating *Brassica juncea* mutant. *Theoretical and Applied Genetics* 99 (3-4), pp. 398-404
- Siciliano, S.D., Germida, J.J. (1998) Mechanisms of phytoremediation: Biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environmental Reviews* 6 (1), pp. 65-79
- Singh, O.V; Jain, R.K. (2003) Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (2): 128-135.
- Snape, J. R., Walkley, N. A., Morby, A. P., Nicklin S., and White G. F., (1997) Purification properties and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter*, *Journal of Bacteriology*, 179, 7796-7802.
- Snellinx, Z., Nepovim, A., Taghavi, S., Vangronsveld, J., Vanek, T., van der Lelie D., (2002) Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* 9, 48-61.

- Song, J., Zhao, F.-J., Luo, Y.-M., McGrath, S.P., Zhang, H. (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils *Environmental Pollution* 128 (3), pp. 307-315
- Soudek, P., Tykva, R., and Vanek, T. (2004) Laboratory analyses of ¹³⁷Cs uptake by sunflower, reed and poplar, *Chemosphere*, 55, 1081-1087
- Spain, J.C. (1995) Biodegradation of nitroaromatic compounds, *Annu.Rev.Microbiol.* 49, 523-555
- Spain, J.C.; Hughes, J. B; Knackmuss H-J.. (Eds.) (2000) Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives, Lewis Publishers, Boca Raton London New York Washington, D.C.
- Steevens, J.A., Duke, B.M., Lotufo, G.R., Bridges, T.S., (2002) Toxicity of the explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in sediments to *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*: low-dose hormesis and high-dose mortality. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (7), 1475–1482.
- Stiborova, M., Schmeiser, H. H., Frei, E. (2000): Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a comparative study. *Phytochemistry* 54(4): 353 – 362
- Stoltz E., Greger M.: (2002): Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, Vol.47, Iss.3, 271
- Strachan, S. D. and Hess., F.D. (1983) The biochemical mechanism of action of the dinitroaniline herbicide oryzalin. *Pestic. Biochem. Phys.* 20:141–150.
- Sun, W. H., Horst, G. L., Drijber, R. A., and Elthon, T. E. (2000). Fate of 2,4,6–trinitrotoluene in axenic sand culture systems containing smooth brome grass. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2038–2046.
- Sung, K., Corapcioglu, M.Y., Drew, M.C., Munster, C.L. (2001) Plant contamination by organic pollutants in phytoremediation. *Journal of Environmental Quality* 30 (6), pp. 2081-2090
- Susarla, S; Medina, VF; McCutcheon, SC. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18 (5): 647-658, Sp. Iss. SI.
- Sýkora, V., Ptáková, H., Manda, J. (2002): Modifikace stanovení dusičnanů spektrofotometrickou metodou s 2,6-dimethylfenolem. In: Sborník konference Hydrochémia 2002, Bratislava, 117-0131
- Teramoto, H., Tanaka, H., Wariishi, H. (2004a) Degradation of 4-nitrophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (3), pp. 312-317
- Teramoto, H., Tanaka, H., Wariishi, H. (2004b) Fungal cytochrome P450s catalyzing hydroxylation of substituted toluenes to form their hydroxymethyl derivatives *FEMS Microbiology Letters* 234 (2), pp. 255-260

- Theorell, H. (1935) *Biochem. Z.* 266, 344-411
- Thompson, P. L., Ramer, L. A., and Schnoor, J. L. (1999) Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine translocation in poplar trees. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:279–284.
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hortensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., and Martinoia, E. (1998). An ABC transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* 13,
- Toze, S., Patterson, B.M., Zappia, L., Power, T., Davis, G., (1997) Sorption and biodegradation of munitions in a fractured basalt aquifer. In: Alleman, B.C., Leeson, A. (Eds.), *In situ and On-Site Bioremediation*, Battelle Press, Columbus, OH, p. 53.
- Urbanski, T. (1958) *Chemie a technologie výbušnin*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha
- Urbanski, T. (1984) *Chemistry and Technology of Explosives*. Pergamon Press Ltd., Oxford.
- Vanderford, M., Shanks, J.V., Hughes, J.B. (1997) Phytotransformation of trinitrotoluene (TNT) and distribution of metallic products in *Myriophyllum aquaticum*. *Biotechnol. Lett.* 19:277-280.
- Vaněk, T., Nepovím, A., Podlipná, R., Zeman, S., Vágner, M., (2003) Phytoremediation of Selected Explosives. *Water, Air, Soil Pollut: Focus* 3, 259-267.
- Vaněk, T., Nepovím, A., Zeman, S. (2000): Phytoremediation of selected explosives in a model system of plant tissue cultures. *Korean Journal of Plant Tissue Culture* 27 (5): 395 – 399
- Vaněk, T. and Schwitzguébel, J.-P. (2003) *Phytoremediation Inventory*, COST Action 837 view, published by ÚOCHB AVČR, Czech Republic
- Vera Tome, F., Rodríguez, B.M.P., Lozano J.C.: (2002): Distribution and mobilization of U, Th and ²²⁶Ra in plant-soil compartments of a mineralized uranium area south-west Spain *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol.59, Iss.1, 41
- Verma, S., Dubey, R.S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* Vol.164, Iss.4, 645
- Vervaeke, P., Luysaert, S., Merten, J., Vos B., Speleers, L., Lust, N. (2001) Dredged sediment as a substrate for biomass production of willow trees established using the SALIMAT technique. *Biomass and Bioenergy*, Vol.21, Iss.2, 81
- Vila, M., Pascal-Lorber, S., Rathahao, E; Debrauwer, L., Canlet, C., Laurent, F. (2005) Metabolism of [C-14]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures. *Environmental Science & Technology* 39 (2): 663-672
- Von Wirén, N., Marschner, H., Romheld, V. (1996) Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc. *Plant Physiology* 111 (4), pp. 1119-1125
- Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Knackmuss, H.J., (1994) Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *J. Bacteriol.* 176 (3), 932–934.

- Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Spain, J.C., Knackmuss, H.J., (1998) Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1), 246–252.
- Wallace, A. and Romney, E.M. (1972) Radioecology and Ecophysiology of desert plants at the Nevada Test Site. Environmental Radiation Division, Laboratory of Nuclear Medicine University of California, Riverside, 432 pp.
- Wang, C. Y., Zheng, D. D., and Hughes, J. B. (2000) Stability of hydroxylamino- and amino-intermediates from reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene. *Biotechnol. Lett.* 22:15–19.
- Watanabe, M. E. (1997) Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environ. Sci. Technol.* 31:A343.
- Wayment, D. G., Bhadra, R., Lauritzen, J., Hughes, J.B., and Shanks, J.V. (1999) A transient study of formation of conjugates during TNT metabolism by plant tissues. *Int. J. Phytoremed.* 1:227–239.
- Weissmahr, K.W., Haderlein, S.B., Schwarzenbach, R.P., (1998) Complex formation of soil minerals with nitroaromatic explosives and other pacceptors. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 369–378.
- Wendt, T. M., J. H. Cornell, and A. M. Kaplan. (1978) Microbial degradation of glycerol nitrates, *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 693-699
- Wenzel W.W., Jockwer F., (1999): Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. *Environmental Pollution* Vol.104, Iss.1, 145
- Whicker, F.W., Pinder, J.E., Bowling, J.W., Alberts, J.J. and Brisbin, I.L. (1990) Distribution of long-lived radionuclides in an abandoned reactor cooling reservoir. *Ecol. Monog.* 60, 471-496
- White, G.F., Snape, J.R., Nicklin, S. (1996) Bacterial biodegradation of Glycerol trinitrate. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38 (2), pp. 77-82.
- Williams, JB. 2002. Phytoremediation in wetland ecosystems: Progress, problems, and potential. *Critical Reviews In Plant Sciences* 21 (6): 607-635.
- Zaripov, S.A., Naumov, A.V., Abdrakhmanova, J.F., Garusov, A.V., Naumova, R.P. (2002) Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 217 (2), pp. 213-217
- Zhang, Q. (1997) Effects of soil extracts from repeated plantation woodland of chinese-fir on microbial activities and soil nitrogen mineralization dynamics. *Plant and Soil* 191 (2), pp. 205-212

- Zhao, J.-S., Halasz, A., Paquet, L., Beaulieu, C., Hawari, J. (2002) Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine and its mononitroso derivative hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine by *Klebsiella pneumoniae* strain SCZ-1 isolated from an anaerobic sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (11), pp. 5336-5341
- Zitting, A., Szumańska, G., Nickels, J. a Savolainen, H. (1982): Acute toxic effects of trinitrotoluene on rat brain, liver and kidney: Role of radical production. *Toxikology* 51: 53 – 64