

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Dominika Luptáková

FYTOEXTRAKCIA UMELÝCH SLADIDIEL Z VODNÝCH
ROZTOKOV

Phytoextraction of Artificial Sweeteners from Aqueous Solutions

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2011

Táto bakalárska práca vznikla v súvislosti s riešením výskumného zámeru MSM0021620857.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto záverečnú prácu spracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť, nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Som si vedomá toho, že prípadné využitie týchto výsledkov získaných v tejto práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné iba po písomnom súhlase tejto univerzity.

V Prahe dňa 1.6.2011

.....

Podpis

Pod'akovanie

V tejto práci by som rada pod'akovala vedúcemu bakalárskej práce Doc. Ing. Stanislavovi Smrčkovi, CSc. za odborné vedenie, užitočné rady a pripomienky, za ochotu a čas, ktorý mi venoval pri jej vypracovávaní.

Taktiež by som rada pod'akovala pani Ing. Šárke Pšondrovej za jej pomoc, ochotu a čas, ktorý mi venovala pri práci na experimentálnej časti bakalárskej práce.

Zoznam skratiek a symbolov

w.s.e. (ekvivalent sladivosti)

FDA (Úrad pre kontrolu potravín a liečiv)

ADI (prijateľná denná dávka)

IARC (Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny)

WHO (Svetová zdravotnícka organizácia)

FAO (Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo)

LD₅₀ (stredná smrteľná dávka)

BMI (index telesnej hmotnosti)

GLP – 1 (glukagónu podobný peptid – 1)

GRAS (všeobecne uznané ako bezpečné)

Abstrakt

Umělá sladidla jsou v současné době široce využívána jako potravinová aditiva. V lidském organismu jsou jen omezeně metabolizována a vylučována jsou cestou renální exkrece. Obrovská množství těchto nebiogenních látek potom kontaminují komunální odpadní vody. Účinnost současných čistíren odpadních vod se udává např. pro cyklamat 99 % a pro sacharin 90 % a uvedené sloučeniny se považují za dobře rozložitelné, byla nalezena rezidua těchto látek v povrchových vodách i podzemních vodách. V případě acesulfamu K nedochází v čistírnách odpadních vod k eliminaci prakticky vůbec. Při dlouhodobém působení je z hlediska biologických studií možnost vzniku rakoviny, ovlivnění gastrointestinálního traktu, či paradoxně zvyšování hmotnosti. V práci byla experimentálně studována možnost fytoextrakce sacharinu a acesulfamu K v „in vitro“ podmínkách s použitím kultivarů slunečnice roční (*Helianthus annuus*), kukuřice seté (*Zea mays*) a řepky olejky (*Brassica napus*). Experimenty byly vyhodnocovány pomocí úbytku studované substance – sacharinu a acesulfamu K v kultivačním mediu dle Murashiga a Skooga. Bylo prokázáno, že použité rostliny jsou schopny extrahovat testovaná sladidla a během pěti až sedmidenní kultivační periody bylo extrahováno 30 – 60 % přidaného acesulfamu K a 50 – 60 % sacharinu, v závislosti na použitém rostlinném druhu. Nejlepší extrakční schopnost prokázaly kultivary slunečnice roční a to 0,1 mg/g čerstvé hmotnosti pro acesulfam K a 0,16 mg/g pro sacharin.

Klíčová slova

Umělé sladidla, cyklamat, sacharin, acesulfam K, fytoextrakce, odpadní vody

Abstrakt

Umelé sladidlá sú v súčasnej dobe široko využívané ako potravinové prídavné látky. V ľudskom organizme sú iba obmedzene metabolizované a vylučované sú cestou renálnej exkrécie. Obrovské množstvo týchto nebiogénnych látok potom kontaminuje komunálne odpadné vody. Účinnosť súčasných čistiarní odpadových vôd sa udáva napríklad pre cyklamát 99 % a pre sacharín 90 % a uvedené zlúčeniny sa považujú za dobre rozložiteľné, avšak boli nájdené rezíduá týchto látok v povrchových vodách i podzemných vodách. V prípade acesulfámu K nedochádza v čistiarniach odpadových vôd k eliminácii prakticky vôbec. Pri dlhodobom pôsobení je z hľadiska biologických štúdií možnosť vzniku rakoviny, ovplyvnenie gastrointestinálneho traktu, či paradoxne zvyšovanie hmotnosti. V práci bola experimentálne študovaná možnosť fytoextrakcie sacharínu a acesulfámu K v „in vitro“ podmienkach s použitím kultivarov slnečnice ročnej (*Helianthus annuus*), kukurice siatej (*Zea Mays*) a repky olejnej (*Brassica napus*). Experimentálne boli vyhodnocované pomocou úbytku študovanej substancie – sacharínu, acesulfámu K v kultivačnom médiu podľa Murashiga a Skooga. Bolo preukázané, že použité rastliny sú schopné extrahovať testované sladidlá a behom päť- až sedemdennej kultivačnej periódy bolo extrahované 30 – 60 % pridaného acesulfámu K a 50 – 60 % sacharínu v závislosti na použítom rastlinnom druhu. Najlepšie extrakčné schopnosti preukázali kultivary slnečnice ročnej a to 0,1 mg/g čerstvej hmotnosti pre acesulfám K a 0,16 mg/g pre sacharín.

Kľúčové slová

Umelé sladidlá, cyklamát, sacharín, acesulfám K, fytoextrakcia, odpadové vody

Abstract

The artificial sweeteners are currently worldwide used as food additives. In human organism they are only partially metabolized and then renally excreted. The big amounts of these abioogenic compounds contaminate municipal wastewaters. The efficiency of cleaning process in the sewage treatment plants (STP) is usually for cyclamate about 99 % and saccharine cca. 90 %. Acesulfame K is in STP practically not eliminated. Although most of artificial sweeteners are considered as good degradable, the residues were found in both surface waters and groundwaters. At long-term treatment can these compounds exhibited biological effect such as cancer genesis, gastrointestinal effects and/or surprisingly body mass increasing. The phytoextraction of saccharine and acesulfame K was experimentally studied by using of „in vitro“ cultivated plants *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Brassica napus*. The phytoextraction was monitored as decrease in medium concentration of tested substance in Murashige-Skoog cultivation medium. It was shown, that used species are able to extract tested substances and during 5 to 7 days 30 – 60 % of acesulfam K and 50 – 60 % of saccharine amounts disappear from cultivation medium depending of used plant species. The best extraction ability was observed at *Helianthus annuus* cultivars - 0.1 mg/g of fresh weight at acesulfam K and 0.16 mg/g at saccharine.

Keywords

Artificial sweeteners, cyclamate, saccharine, acesulfame K, phytoextraction, wastewaters

Obsah

Obsah.....	8
1 Úvod.....	10
1.1 Cieľ práce	10
2 Teoretická časť	12
2.1 Alternatívne sladidlá, umelé sladidlá.....	12
2.1.1 Definícia a delenie sladidiel.....	12
2.1.2 Vlastnosti sladidiel.....	13
2.1.3 Prehľad najpoužívanejších umelých sladidiel.....	13
2.1.4 Spotreba a produkcia sladidiel vo svete a EÚ.....	15
2.1.5 Legislatíva.....	16
2.1.6 Umelé sladidlá	18
2.2 Umelé sladidlá v životnom prostredí.....	26
2.2.1 Prítomnosť umelých sladidiel v pôde	26
2.2.2 Výskyt umelých sladidiel vo vode.....	27
2.3 Biologické účinky umelých sladidiel	29
2.3.1 Vplyv umelých sladidiel na vznik rakoviny	29
2.3.2 Zvyšovanie telesnej hmotnosti vplyvom umelých sladidiel	30
2.3.3 Účinok umelých sladidiel na gastrointestinálny trakt.....	31
2.3.4 Poškodenie mozgu ako dôsledok užívania umelých sladidiel	32
2.4 Fytoremediačné techniky.....	33
3 Experimentálna časť.....	36
3.1 Použité chemikálie.....	36
3.2 Prístroje.....	36
3.3 Rastliny využívané na experiment.....	37
3.4 Pracovný postup	37
3.4.1 Príprava rastlinných kultúr.....	37

3.4.2 Fytoextrakcia umelých sladidiel	38
4 Výsledky a diskusia.....	39
4.1 Acesulfám K	40
4.2 Sacharín	44
4.3 Fytoextrakčná schopnosť eliminácie umelých sladidiel jednotlivých druhov rastlín z roztokov	46
5 Záver.....	48
Referencie.....	49

1 Úvod

Umelé sladidlá používané ako náhrada cukru sú v dnešnej dobe veľmi rozšírenými potravinovými prídavkami v nízko kalorických, nealkoholických nápojoch, diabetických jedlách, pečive, žuvačkách, cereáliách, dezertoch, ale taktiež v liečivách či hygienických výrobkoch. Tieto látky vo väčšine prípadov neobsahujú kalórie, alebo ich obsahujú len veľmi málo, čím neposkytujú organizmu energiu.

Viacere umelé sladidlá nepodliehajú metabolickým zmenám a sú vylučované prostredníctvom moču a stolice v nezmenenej forme, a teda sa dostávajú ďalej do životného prostredia, kde sa stávajú potenciálnymi polutantmi. Ich výskyt bol zaznamenaný v mestských odpadových vodách, avšak aj v už prečistených odpadových vodách, čo svedčí, že ani čistiarne odpadových vôd nie sú schopné úplne eliminovať umelé sladidlá. Kontamináciou odpadových vôd, podzemných vôd a následne povrchových vôd sa tieto látky dostávajú do celého ekosystému vôd a dokonca ich výskyt bol zaznamenaný aj v pitnej vode. Okrem vôd boli umelé sladidlá zaznamenané aj v pôdach, čím sa potvrdzuje ich všadeprítomnosť v životnom prostredí.

Vzhľadom na ich prítomnosť všade okolo nás sa stále viac hovorí o ich možnom negatívnom vplyve, či už na ekosystém, alebo aj na človeka, zahrňujúc napríklad možné nežiaduce napodobňovanie funkcie sacharózy sukralózou vo vodách, či možný vznik rakoviny, zvyšovanie hmotnosti, alebo neurologické problémy spôsobené konzumáciou umelých sladidiel. Nájdenie vhodného spôsobu eliminácie týchto látok zo životného prostredia by preto mohlo napomôcť k eliminácii umelých sladidiel ako polutantov z ekosystému a zabrániť im v ich ďalšom rozširovaní.

1.1 Cieľ práce

Cieľom bakalárskeho projektu je overiť možnosť fytoextrakcie vybraných umelých sladidiel používaných vo veľkých kvantách v potravinárskom priemysle. Existuje predpoklad ich prestupu do životného prostredia a možný je i atak potravinových reťazcov voľne žijúcich živočíchov. Často sú tiež diskutované zdravotné riziká používania týchto zlúčenín.

Projekt zahrňuje:

1) Rešeršné spracovanie problematiky

- umelé sladidlá a ich osud v organizme
- vstup do životného prostredia
- zdravotné riziká

2) Fytoextrakcia umelých sladidiel v in vitro usporiadaní

- Kultivácia vybraných rastlinných druhov
- Fytoextrakčné experimenty
- Analýza kultivačných médií
- Vyhodnotenie účinnosti fytoextrakcie

2 Teoretická časť

2.1 Alternatívne sladidlá, umelé sladidlá

2.1.1 Definícia a delenie sladidiel

Sladidlá sú alternatívnymi látkami cukru, ktoré dodávajú jedlu sladkú chuť a sú používané ako čiastočná alebo úplná náhrada sacharózy [1]. Sú používané ako náhrada cukru pri produkcii nízkoenergetických potravín, potravín nevyvolávajúcich kaz, alebo jedál bez pridaného cukru na predĺženie trvanlivosti, rovnako ako pri príprave diabetických produktov [2]. Umelé sladidlá nahrádzajú cukor v značnom množstve v jedlách alebo nápojoch a tiež v liečivách i hygienických výrobkoch. Poskytujú nedostatočnú alebo žiadnu energiu, pretože nie sú pri spracovaní v organizme zdrojom energie ako sacharidy. Ich konzumáciou nie je ovplyvnená hladina inzulínu, čím sa stávajú vhodné pre diabetikov a tiež môžu napomôcť zníženiu príjmu kalórií. Umelé sladidlá môžu preventívne pôsobiť proti vzniku zubného kazu, pretože väčšina z nich nie je metabolizovaná ako cukor, alebo sú iba mierne fermentované ústnou mikroflórou [3].

Používané umelé sladidlá je možné rozdeliť [4]:

- 1) podľa pôvodu:
 - a) prírodné - thaumatin, steviosid
 - b) syntetické identické s prírodnými - polyalkoholy
 - c) syntetické - sacharín, cyklamát

- 2) podľa nutričnej hodnoty
 - a) energetické - polyalkoholy okrem erythritolu
 - b) neenergetické - synteticky vyrobené a zostávajúce prírodné sladidlá

- 3) podľa chemickej štruktúry
 - a) proteíny, peptidy - thaumatin, aspartám
 - b) halogénové disacharidy - sukralóza
 - c) terpény - steviosid
 - d) chalkóny - neohesperidin DC

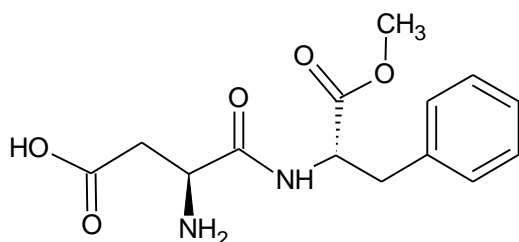
2.1.2 Vlastnosti sladidiel

Sladidlá sa posudzujú podľa sladivosti vzhľadom k bielemu cukru – sacharóze takzvaným ekvivalentom sladivosti, ktorý je číselne značený tiež w.s.e. z anglického názvu „white sugar equivalent“ [5]. Umelé sladidlá typicky presahujú sladivosť sacharózy 30 až 13 000-krát [6].

Dôležitým ukazovateľom akosti alternatívnych sladidiel je tiež chuťový vnem, ktorý by mal byť čo najbližšie k bielemu cukru a bez príchute [5]. Môžu tiež však vyvolať umelú, kovovú pachuť alebo pachuť podobnú sladkému drievku [3]. Horkú chuť vykazuje predovšetkým sacharín, cyklamát, acesulfám K a aspartám. Tepelnou úpravou vystúpi napríklad horká chuť aspartámu, ktorý je dipeptid tvorený fenylalanínom a kyselinou asparágovou. Po rozštiepení bude prevládať horká chuť práve fenylalanínu. Výrazný podiel na vnímaní horkej chuti má tiež genetická výbava jedinca a koncentrácia sladidla v potravine [4].

2.1.3 Prehľad najpoužívanejších umelých sladidiel

Aspartám

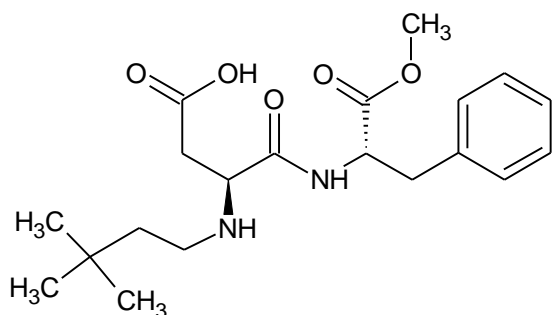


Obr. 2.1.3.1 Štruktúra aspartámu.

Aspartám bol objavený chemikom G. D. Searle v roku 1965 pri štúdiu novej liečby žalúdočných vredov a na trh bol uvedený v roku 1981 [6]. Aspartám je metylester dipeptid z kyseliny asparágovej a fenylalanínu. Je to biely prášok, ktorý nezanecháva horkú, kovovú pachuť, alebo pachuť po chemikáliách, a ktorý je svojou sladivosťou veľmi podobný sacharóze [1]. Aspartám je 200-krát sladší než sacharóza a je tiež predávaný pod značkou Equal a NutraSweet [6]. Poskytuje 16,7 kJ/g [3]. Stabilita aspartámu je ovplyvnená vlhkosťou, pH (neutrálne alebo zásadité) a dlhotrvajúcou zvýšenou teplotou (varenie, sterilizácia), ale nie jeho koncentráciou. Je stabilný v kyslom prostredí medzi pH 3 a pH 5. Jeho stabilita klesá nad pH 5

a so zvyšujúcou sa teplotou [1]. Po požití je aspartám hydrolyzovaný v črevnom lúmene na jeho zložky, a to kyselinu asparágovú, fenylalanín a metanol [6]. Tieto zložky sú ďalej absorbované do krvi, kde sa metabolizujú. Podľa Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady Európy a taktiež FDA musia byť potraviny s obsahom aspartámu označené, že sú zdrojom fenylalanínu, ktorý môže spôsobovať ťažkosti ľuďom trpiacim dedičnou chorobou fenylketonúriou [2, 6].

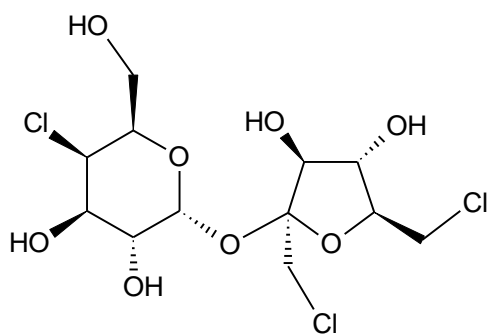
Neotam



Obr. 2.1.3.2 Štruktúra neotamu.

Neotam je modifikovanou formou aspartámu. Je 7 000 až 13 000-krát sladší než sacharóza a neobsahuje kalórie. Je aj 30 až 60-krát sladší než aspartám [6, 7]. Je to biely prášok vyrobený z aspartámu a 3,3-dimetylbutyraldehydu. Po orálnom požití je približne 20 – 30 % podanej dávky aspartámu absorbované a rýchlo rozložené na hlavný metabolit *N*-[*N*-(3,3-dimetylbutyl)-*L*- α -aspartyl]-*L*-fenylalanín (deesterifikovaný neotam), metanol v zanedbateľnom množstve a ďalšie minoritné metabolity. Neotam a jeho metabolity sú rýchlo eliminované prostredníctvom moču a stolice [7]. Neotam môžeme nájsť v pečive, nealkoholických nápojoch, žuvačkách, mrazených dezertoch, džemoch, želatíne, rôsoloch, pudingoch, konzervovanom ovocí, sirupoch a v polevách [6]. Od roku 2002 bol neotam povolený FDA a od novembra 2007 je povolený aj v Európskej únii [5].

Sukralóza



Obr. 2.1.3.3 Štruktúra sukralózy.

Sukralóza bola objavená v roku 1976 [6]. Je to halogenovaný disacharid chemicky známy ako 1,6-dichlor-1,6-dideoxy- β -*D*-fruktofuranosyl-4-chlor-4-deoxy- α -*D*-galaktopyranosid. Je to jediné sladidlo odvodené od sacharózy. Sukralóza patrí medzi nekalorické sladidlá a je 400 – 800-krát sladšia než sacharóza a dvakrát sladšia než sacharín. Relatívna hodnota sladivosti sukralózy závisí od hodnoty pH, teploty a koncentrácie [1]. Toto sladidlo nezanecháva horkú chuť alebo kovovú pachuť. Značné množstvo nerozštiepenej sukralózy, až 85 – 97 %, je vylúčené prostredníctvom moču a stolice. Z množstva, ktoré prejde črevnou stenou, sú len 3 – 4 % metabolizované a konjugujú sa s kyselinou glukuronovou. Samotná sukralóza a konjugát s kyselinou glukurónovou sú vylučované močom [4]. Sukralóza bola schválená FDA v roku 1998 na používanie v pätnástich kategóriách potravín zahrňujúc stolné sladidlo známe napríklad pod obchodným názvom Splenda. V roku 1999 FDA schválilo používanie tohto sladidla vo všetkých potravinách [6].

Informácie o sacharíne, acesulfáme K a cyklamáte sú bližšie uvedené v časti 2.1.6.

2.1.4 Spotreba a produkcia sladidiel vo svete a EÚ

Prírodné a umelé sladidlá sú významnou súčasťou svetového obchodu s potravinami. V roku 2003 dosiahla svetová produkcia v prípade cukru 143 milióna ton (EÚ 20,9 mil. ton), v prípade škrobových sladidiel a alkoholických cukrov 17,6 milióna ton (w.s.e.) a v prípade náhradných sladidiel 11,6 milióna ton (w.s.e.) [8].

Tab. 2.1.4.1 Spotreba sladidiel v roku 2004.

	Sladidlo	Hodnota
Spotreba vo svete	Cukor	143,3 mil. ton (hodnoty surového cukru)
Spotreba v EÚ	Cukor	20,6 mil. ton (hodnoty surového cukru)
	Škrobové sladidlá a alkoholické cukry	3 mil. ton w.s.e.
	Umelé sladidlá	1,9 mil. ton w.s.e.

Tab. 2.1.4.2 Čistá spotreba umelých sladidiel v roku 2003.

Spotreba umelých sladidiel vo svete	80 000 ton	11,6 mil. ton w.s.e.
Spotreba umelých sladidiel v EÚ	13 000 ton	1,9 mil. ton w.s.e.

Do roku 2008 bol predpokladaný nárast spotreby náhradných sladidiel o 8,3 % [8].

Tab. 2.1.4.3 Svetová spotreba niektorých umelých sladidiel vo svete.

Sladidlo	Svetová spotreba sladidiel (mil. ton w.s.e.)			Nárast spotreby 1995/2005 (%)
	1985	1995	2005	
Sacharín	5,3	8,1	11,0	36
Aspartám	1,2	2,2	4,1	86
Cyklamát	0,5	0,5	1,3	160
Ostatné	0,05	0,3	0,5	67

Na celosvetovej spotrebe náhradných sladidiel má najväčší podiel Ázia (49 %), Amerika (28 %) a Európa (20 %), zatiaľ čo ostatné krajiny sveta predstavujú iba 3 % [8].

Čo sa týka produkcie náhradných sladidiel, bolo očakávané, že Ázia bude mať do roku 2010 až 90 % podiel na svetovej produkcii vzhľadom k tomu, že už v roku 2003 sa Čína podieľala na tomto obchode až 77 %. Pri umelých sladidlách bol očakávaný medziročný rast produkcie 2,7 až 2,9 % [8].

2.1.5 Legislatíva

Potravinové prísady sú ohodnocované a/alebo regulované mnohými národnými a medzinárodnými orgánmi. Medzi medzinárodné orgány patria Spoločnosť expertov FAO / WHO pre prídavné látky (Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization Expert Committee on Food Additives, (JECFA)), Komisia Codex Alimentarius (The Codex

Alimentarius Commission), Vedecký výbor pre potraviny (Scientific Committee for Food of the Commission of the European Union) [9].

V USA potravinárske aditívne látky sú pod kontrolou Úradu pre kontrolu potravín a liečív (Food and Drug Administration, (FDA)), podľa Zákona o potravinách, liečivách a kozmetike (Food, Drug & Cosmetic Act) a jeho dodatkov. FDA prehodnocuje údaje o všetkých nových látkach, ktoré by sa mali stať súčasťou jedál [6, 9].

Kľúčovou legislatívou Európskej Únie, ktorá zastrešuje problematiku náhradných sladidiel, je Smernica Európskeho parlamentu a Rady 94/35/ES z 30.06.1994, vyplývajúca z rámcovej Smernice 89/107/EHS o prídavných potravinárskych látkach, ktorá sa týka použitia sladidiel v potravinách s dopĺňujúcimi Smernicami 96/83/ES a 2003/115/ES, ako aj Smernice 2004/46/ES a 95/31/ES a 2008/60/ES ohľadom definícií, identifikácie a kritérií čistoty náhradných sladidiel [2, 8]. Táto smernica sa tiež zaoberá vymedzením pojmov, označovaním obalov potravín obsahujúcich sladidlá a podmienkami použitia náhradných sladidiel pri výrobe potravín [4].

V Smernici Rady 89/107/EHS sú uvedené sladidlá, ktoré nemôžu byť použité v jedlách pre dojčatá a malé deti zahrňujúc jedlá pre dojčatá a malé deti, ktoré nie sú v dobrom zdravotnom stave [2].

Povinnosťou členských štátov EÚ je zaviesť systém pravidelného prieskumu na sledovanie spotreby sladidiel. Na základe týchto informácií podmienky použitia sladidiel, ako sú stanovené podľa nariadenia, môžu byť upravené, ak je to nevyhnutné [2].

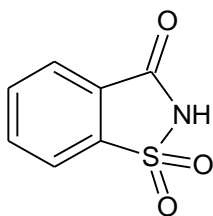
Potraviny, alebo stolné sladidlá obsahujúce polyoly a/alebo aspartám musia obsahovať nasledujúce upozornenia [2]:

- polyoly: „nadmerná konzumácia môže mať laxatívne účinky“
- aspartám: „obsahuje zdroj fenylalanínu“
- soľ aspartám – acesulfámu: „obsahuje zdroj fenylalanínu“

Ako súčasť hodnotenia potravinárskych prídavných látok regulačné orgány stanovili takzvanú prijateľnú dennú dávku (ADI). ADI pre človeka, vyjadrené v pomere k telesnej hmotnosti, je množstvo potravinárskej prídavnej látky, ktoré môže byť prijímané denne v strave v priebehu celého života bez rizika. ADI môže byť použitá ako štandard na hodnotenie skutočného príjmu látky a ako pomoc pri preverovaní ďalších možných využití v potravinárskych prísadách. ADI sa vyjadruje v miligramoch na kilogram telesnej hmotnosti [9].

2.1.6 Umelé sladidlá

2.1.6.1 Sacharín

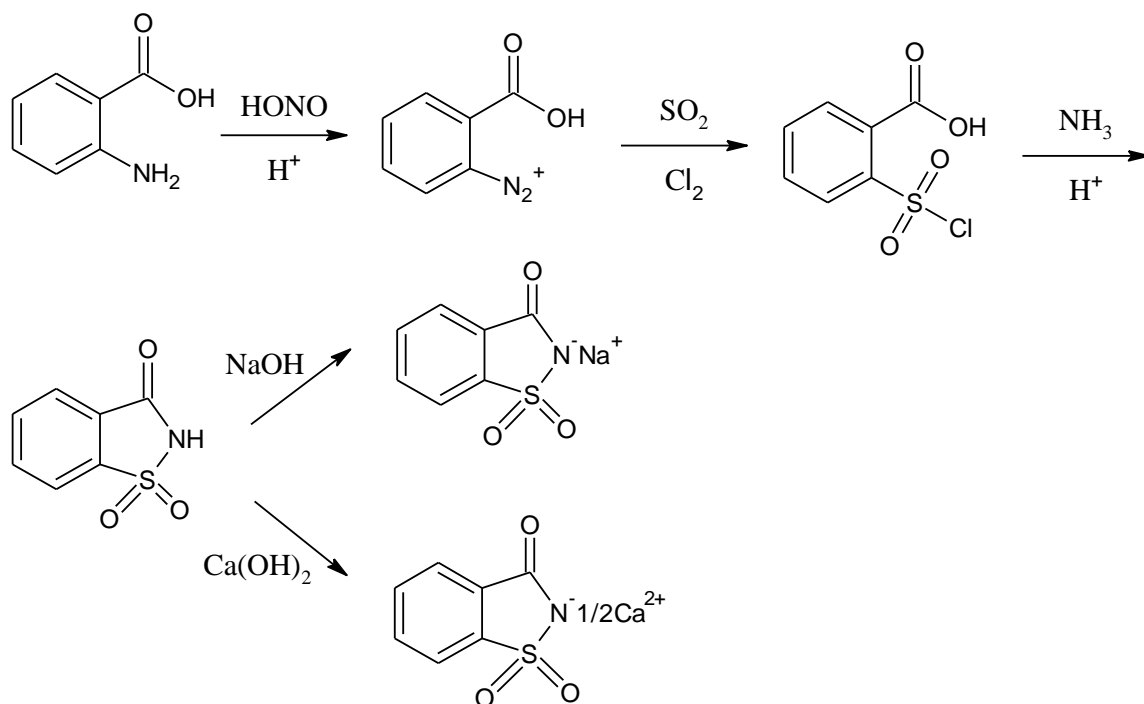


Obr. 2.1.6.1.1 Štruktúra sacharínu.

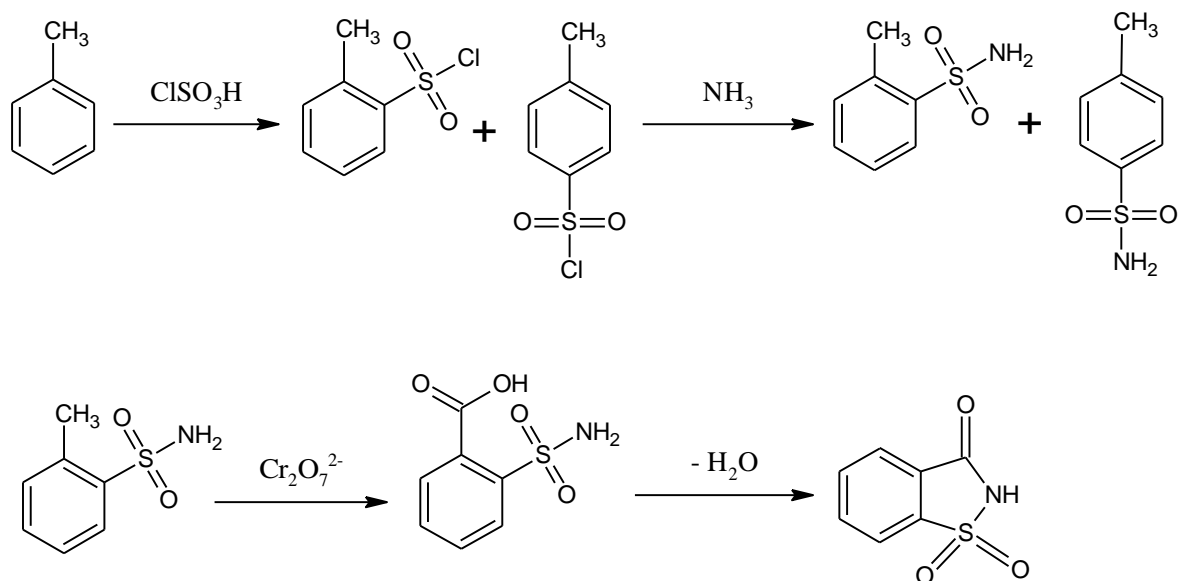
Sacharín, prvé umelé sladidlo, bol vynájdený náhodne rovnako ako väčšina umelých sladidiel. V roku 1879 Constantine Fahlberg, ktorý pracoval v laboratóriu Ira Remsena na univerzite Johns Hopkinsa, skúmal oxidatívny mechanizmus toluénsulfonamidu, čo bolo časťou výskumu profesora Remensa. Počas výskumu sa látka náhodne dostala na jeho prst, ktorý si neskôr oblizol, čím zistil, že táto látka má sladkú chuť, a tým vynášiel sacharín [6]. Názov sacharín je odvodený z latinského názvu pre cukor *saccharum* [9].

Už v roku 1900 Fahlberg ohlásil ročnú produkciu sacharínu až na 190 000 kg. Použitie sacharínu vzrástlo výrazne počas 1. Svetovej vojny a následne potom ako dôsledok prideľovania cukru, čo bolo najmä viditeľné v Európe. Od roku 1917 bol sacharín bežne používaným stolným sladidlom v Amerike aj Európe a v roku 1923 bol uvedený aj na ďalekom Východe. Konzumácia sacharínu pokračovala aj medzi svetovými vojnami so vzrastajúcim počtom produktov, v ktorých bol sacharín použitý a uskladnenie cukru počas 2. Svetovej vojny opäť spôsobilo výrazný nárast jeho použitia [9].

Sacharín môže byť vyrobený rôznymi spôsobmi, a to z toluénu (Remsen &Fahlberg, 1879), z anhydridu kyseliny ftalovej alebo kyseliny ftalovej (Maumée, 1951) a o-chlórtoleúnu (Bungard, 1967). Najrozšírenejšou metódou na výrobu sacharínu je Remsen – Fahlbergov a Mauméeho proces [10]. Produktom je kryštalický biely prášok veľmi stabilný v suchom stave [1]. Je to mierne silná kyselina s iba malou rozpustnosťou vo vode [9]. Je rozpustný v acetóne, etanole, glycerole a je mierne rozpustný v chloroforme a dietylétere [1].



Obr. 2.1.6.1.2 Výrobný proces sacharínu (Maumée proces, 1951) [9].



Obr. 2.1.6.1.3 Výrobný proces sacharínu (Remsen &Fahlberg, 1879) [9].

Sacharín je komerčne dostupný v troch formách: ako kyselina, vápenatá a sodná soľ sacharínu. Najviac bežne používanou formou je sodná soľ sacharínu a to vďaka jej vysokej rozpustnosti, vysokej stabilite a ekonomickej výhodnosti [9]. Sacharín neobsahuje kalórie a je približne 300-krát sladší než cukor. Môžeme ho nájsť v rôznych produktoch ako napríklad v nealkoholických nápojoch, pečive, džemoch, žuvačkách, konzervovanom ovocí, cukríkoch, dezertných polevách alebo šalátových dressingoch. Sacharín sa tiež používa v kozmetických produktoch (zubná pasta, ústna voda, lesk na pery), vitamínoch a liekoch [6].

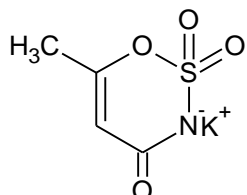
Tiež je známy pre svoju horkú chuť a kovovú pachuť, čo môže byť maskované prídavkom iných sladidiel ako cyklamát, aspartám, acesulfám K alebo sukralóza [1]. Prvá zmes, kde bol použitý sacharín, bola na báze sacharín : ducín. Neskôr sa objavil veľmi rýchly nárast používania zmesi cyklamát sodný : sacharín, ešte pred zakázaním cyklamátu v U.S., a to hlavne vo výrobe diétnych nealkoholických nápojov. Táto kombinácia bola vzájomne veľmi výhodná, pretože samotný cyklamát má tiež sporné chuťové vlastnosti [9]. Horká alebo kovová trpká chuť spojená so sladivosťou sacharínu inklinuje k zintenzívneniu so stúpajúcou koncentráciou [11]. Našťastie prahová koncentrácia, kedy sa začne prejavovať horká chuť, je vyššia ako prahová koncentrácia sladkej chuti a iba 25 % populácie Európanov je schopné detekovať túto pachuť [9, 11]. Profil sladivosti sacharínu je rozdielny od profilu sladivosti sacharózy. Sacharín má veľmi pomalý sladivý účinok, ktorý rastie pozvoľne až do dosiahnutia jeho maxima a má pretrvávajúcu intenzitu sladivosti [1].

Ďalšou výhodou sacharínu je jeho vysoká stabilita a to vo všetkých formách vo vodnom roztoku v širokom rozmedzí pH. Bolo zistené, že sacharín a jeho soli nepodliehajú detekovateľnému rozkladu počas niekoľkých rokov. Jedine za veľmi vyhrtených podmienok, a to pri vysokej teplote, nízkom alebo vysokom pH mimo rozsahu 3,3 – 8,0 a po dlhom čase, sacharín hydrolyzoval v merateľnom množstve. Produkty hydrolyzy boli 2-sulfobenzoová kyselina a 2-sulfamoylbenzoová kyselina [9].

Sacharín patrí medzi najštudovanejšie sladidlá z toxikologického hľadiska. Na základe štúdií na potkanoch bolo dokázané, že potkanom mužského pohlavia kŕmeným vysokými dávkami sacharínu sodného spôsobujú rakovinu močového mechúra. Avšak ďalšie štúdie na ľuďoch nepreukázali nepriaznivý vplyv sacharínu. V roku 1998 IARC zaradila sacharín do nižšej skupiny zo Skupiny 2B látok (možné karcinogény pre človeka) do Skupiny 3 (látky, kde je jasný dôkaz, že mechanizmus karcinogenity u pokusných zvierat nefunguje u ľudí) [9]. Sacharín nie je

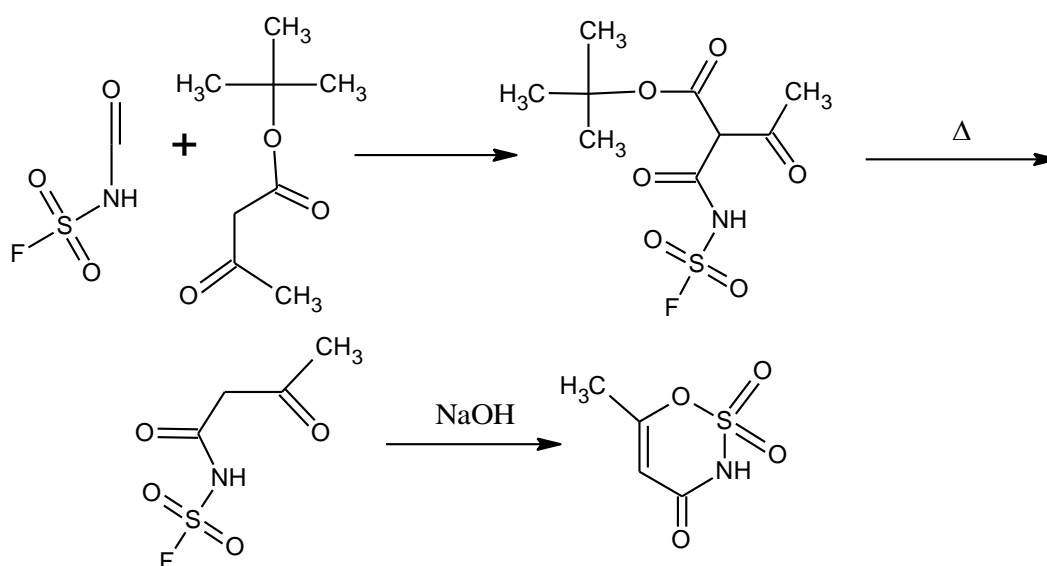
v tele metabolizovaný a prechádza tráviacim traktom bez zmeny. Je vylúčený, nezmenený, prostredníctvom moču [1, 6, 9, 10]. Hodnota ADI pre sacharín je stanovená na 5 mg/kg telesnej váhy [4]. Sacharín je medzinárodne značený ako E954 [12].

2.1.6.2 Acesulfám K (Acesulfám draselný)



Obr. 2.1.6.2.1 Štruktúra acesulfámu K.

Acesulfám K bol objavený v roku 1967 chemikmi Jensenom a Karlom Claussom. Systematický výskum dihydrooxatiazínových dioxidov odhalil niekoľko látok z tejto skupiny, ktoré chutili sladko. Zmenou substituentov na kruhu v pozícií 5 a 6 ukázal badateľný vplyv na intenzitu a čistotu sladivosti. Prehodnotením rôznych látok sa dokázalo, že 6-metyl-1,2,3-oxatiazin-4(3H)-on-2,2-dioxid má najpriaznivejšie chuťové vlastnosti. Pretože produkcia tejto látky sa zdala byť menej náročná než produkcia iných dihydrooxatiazónových dioxidov, táto látka bola vybraná na ohodnotenie spôsobilosti ako sladidla určeného na použitie v jedlách a nápojoch. V roku 1978 WHO zaregistrovala názov - soľ acesulfám draselný ako všeobecný názov pre túto látku [9].



Obr. 2.1.6.2.2 Syntéza acesulfámu z fluorosulfonyl izokyanátu a terc-butyl-acetoacetátu [13].

Acesulfám K je približne 200-krát sladší než cukor a neobsahuje kalórie [6]. Je to biely, kryštalický prášok bez zápachu. Jeho špecifická hustota je 1,83 g/cm³. Acesulfám draselný sa rozpúšťa rýchlo pri izbovej teplote a jeho rozpustnosť vo vode pri 20°C je 270 g/l. Rozpustnosť prudko stúpa so zvyšujúcou sa teplotou a to na viac ako 1000 g/l pri 100°C. Jeho sladká chuť je vnímaná rýchlo a bez nepríjemného oneskorenia. V porovnaní s inými umelými sladidlami (aspartám, alitam) má acesulfám K rýchly nástup účinku sladivosti [9].

Acesulfám K je veľmi stabilný v jedle, nápojoch a kozmetických prípravkoch za normálnych podmienok skladovania. Za extrémnych podmienok pH a teploty, môže dôjsť k pozorovateľnému rozkladu a k vytvoreniu acetónu, oxidu uhličitého, hydrogénsíranu amónneho alebo amido-sulfátu. V kyslom prostredí (pH 2,5) sa vytvárajú v nepatrnom množstve acetoacetamid a acetoacetamin *N*-sulfonová kyselina ako nestabilné medziprodukty rozkladu. V zásaditom prostredí (pH 10,5) sa môžu vyskytnúť kyselina 2-oxobutanová a acetoacetamid *N*-sulfonová kyselina [14].

Acesulfám K patrí medzi sladidlá s horkou chuťou a to najmä pri jeho vysokej koncentrácii [9]. Má oneskorenú horkú chuť, ktorá je intenzívnejšia a dlhšie pretrvávajúca [11]. Synergický efekt acesulfámu K s glukózou, fruktózou, sacharózou a sukralózou zvyšuje ich sladivosť [6]. Silné synergické zvýšenie chuti bolo zaznamenané aj v zmesi acesulfámu K a aspartámu alebo cyklamátu sodného, zatiaľ čo iba slabé zvýšenie chuti bolo vnímané v zmesi acesulfámu K so sacharínom. Acesulfám a aspartám spolu chutia približne 100-krát sladšie ako roztok sacharózy obsahujúci 100 g/l. Avšak zmes týchto dvoch sladidiel chutí až 300-krát sladšie ako rovnaký roztok sacharózy [9].

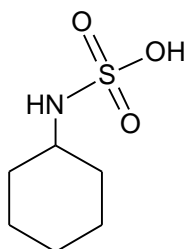
Acesulfám K nie je taktiež metabolizovaný v tele a je vylučovaný močom a stolicou v nezmenenej podobe. Viacnásobné dávky tohto sladidla nepreukázali akumuláciu acesulfámu K v tkanivách [14].

Veľmi dôležitou súčasťou ohodnocovania sladidiel sú predovšetkým toxikologické štúdie, ktorými by mala byť zdravotná nezávadnosť sladidiel preukázaná a to pred uvedením na trh. V prípade acesulfámu K viaceré toxikologické štúdie zamerané na akútnu toxicitu, chronickú toxicitu, mutagenitu, karcinogenitu a teratogenitu dokázali jeho zdravotnú nezávadnosť. LD₅₀

pri orálnom podaní je stanovená v rozmedzí hodnôt 6,9 – 8,0 g/kg telesnej hmotnosti a pri intraperitonálnom podaní je LD₅₀ 2,2 g/kg telesnej hmotnosti [9].

Prijateľná denná dávka acesulfámu bola stanovená na 0 – 9 mg/kg a neskôr bola zvýšená na hodnotu 0 – 15 mg/kg. V EÚ bola prijatá hodnota ADI 0 – 9 mg/kg telesnej hmotnosti [9]. Acesulfám K je využívaný ako stolné sladidlo, a tiež ho nájdeme v nealkoholických nápojoch, potravinových prípravkoch, mrazených dezertoch, raňajkových cereáliách, žuvačkách, pečive, cukríkoch, kvapkách proti kašľu a v cukríkoch na svieži dych [6, 14]. Medzinárodné označenie v členských štátoch EÚ pre acesulfám K je E950 [12].

2.1.6.3 Cyklamát



Obr. 2.1.6.3.1 Štruktúra cyklamátu.

Michael Sveda objavil cyklamát v roku 1937 pri vývoji antipyretík. Pri práci si odložil cigaretu na laboratórny stôl so stopami pripravovaných látok, a keď si ju opäť vložil do úst, zistil výrazne sladkú chuť [12].

Cyklamát sodný vstúpil na trh v U.S. potom ako ho FDA schválila v roku 1951 [15]. Cyklamát je komerčný názov pre kyselinu cyklámovú alebo kyselinu cyklohexyl-sulfámovú, ktoré sú všeobecne používané ako sodné alebo vápenaté soli. Cyklohexylamín, metabolit, je produkt rozpadu cyklamátu s horkou chuťou [1].

Cyklamát sodný patrí medzi nekalorické sladidlá a je 30-krát sladší než sacharóza. Je to nezapáchajúci, biely, kryštalický prášok, alebo je vo forme kryštálov [16]. Teplota topenia kyseliny cyklámovej je 169 – 170 °C, je dobre rozpustná vo vode s rozpustnosťou 1 g/ 7,5 ml vody a vyznačuje sa citrónovo kyslou sladivosťou. Naopak má limitovanú rozpustnosť v olejoch a nepolárnych rozpúšťadlách. Cyklamát sodný a vápenatý sú silné elektrolyty, ktoré sú značne

ionizované v roztoku, majú pomerne neutrálny charakter a majú malú pufracnú kapacitu. Cyklamátové roztoky sú stabilné voči teplu, svetlu a vzduchu v širokom rozmedzí pH [9].

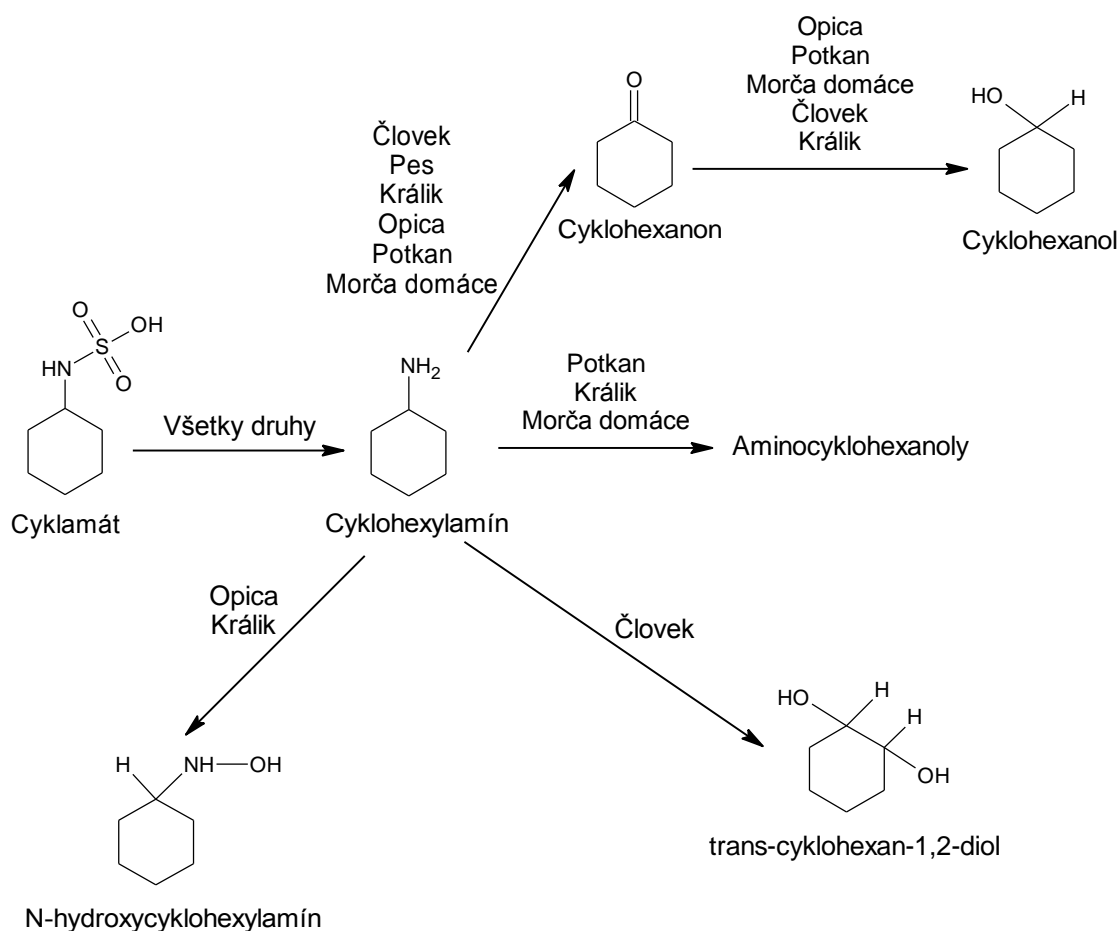
Cyklohexylamín, ktorý je počiatočným materiálom pri syntéze cyklamátu a aj metabolitom cyklamátu, má zreteľne rozdielne vlastnosti. Cyklohexylamín je báza, vyznačuje sa rybím zápachom a horkou chuťou. Je to číra, bezfarebná kvapalina, ktorá je miešateľná s vodou, alkoholom a nepolárnymi rozpúšťadlami a má teplotu topenia pri 134,5 °C [9].

Cyklamát sa vyznačuje prirodzenejšou sladkou chuťou v porovnaní so sacharínom a tiež vyššou stabilitou pri vyšších teplotách. Využíva sa hojne v potravinárskom priemysle [12]. Sladivosť cyklamátu vzrastá až na maximálnu úroveň pomalšie než sacharóza a pretrváva dlhšiu dobu. Primárne použitie cyklamátu je ako nekalorické sladidlo obyčajne používané v kombinácii s inými sladidlami, ale tiež môže byť použitý ako ochucovadlo na zamaskovanie nepríjemnej chuti liekov [9]. Cyklamát sa veľmi často využíva aj v zmesiach a najfrekventovanejšia kombinácia je zmes cyklamát : sacharín. Najčastejšie je táto zmes používaná v pomere 10 : 1 a poskytuje intenzívnu sladivosť sacharínu so schopnosťou cyklamátu potlačiť horkú chuť sacharínu [1]. Nedávno bolo tiež popísané použitie cyklamátu v kombinácii s aspartámom alebo s acesulfámom K a tiež v trojkombinácii s aspartámom a sacharínom [9].

Cyklamát bol dlhé roky komerčne používaný ako ochucovadlo, ale v roku 1970 bol v U.S., Kanade a UK zakázaný kvôli zisteným podozrivým karcinogénnym účinkom [1]. Práve v roku 1969 bolo na základe štúdií na potkanoch kŕmených zmesou cyklamát : sacharín v pomere 10 : 1 zistené, že cyklamát spôsobuje u potkanov rakovinu močového mechúra. Na základe týchto zistení bol cyklamát v roku 1970 vylúčený z GRAS zoznamu a zakázaný na používanie v jedlách a nápojoch. Avšak ďalšie štúdie preukázali, že ani cyklamát ani cyklohexylamín nie sú karcinogénne pre človeka v množstve, ktoré je odporúčané pre diétne jedlá [9].

Technickými kvalitami vyniká toto sladidlo hlavne v jeho stabilite ako pri nízkej tak aj vysokej teplote, v širokom rozmedzí pH, za prítomnosti svetla, kyslíka a iných potravinárskych látok. Cyklamát má za normálnych podmienok použitia priaznivý chuťový profil a nezanecháva nepríjemnú pachuť. Je lepší ako sacharóza v maskovaní horkosti a zlepšuje ovocnú príchuť [9].

Cyklamát je pomaly a neúplne absorbovaný v žalúdočne – črevnom trakte. Nie je metabolizovaný na cyklohexylamín v tkanivách cicavcov, ale cyklohexylamín je skôr formovaný v črevnom trakte pôsobením črevnej mikroflóry na neabsorbovaný cyklamát. Niektorí jedinci nie sú schopní transformovať cyklamát na cyklohexylamín. Retrospektívne analýzy štúdií, ktoré sa pokúsili určiť množstvo jedincov, ktorí sú schopní premieňať cyklamát na cyklohexylamín zistili, že len 25 % skúmaných jedincov bolo schopných tejto premeny. Výskyt premien bol mierne nižší u Európanov a Severných Američanov ($\approx 20\%$), ktorí dostávali aspoň tri denné dávky, ale zdal sa byť vyšší medzi Japoncami ($\geq 80\%$, v štúdiách zahrňujúcich 60 jedincov). Je odhadované, že iba okolo 3 % populácie je schopné premieňať viac ako 20 % cyklamátovej dávky na cyklohexylamín a $\leq 1\%$ premieňa 60 % alebo viac. Hladina 60 % je maximálne možné množstvo, pretože iba neabsorbovaný cyklamát môže byť metabolizovaný a absorpcia cyklamátu je priemerne 40 % [9]. Cyklohexylamín môže byť ďalej premieňaný na iné metabolity [13].



Obr. 2.1.6.3.2 Metabolizmus cyklamátu v organizme [13].

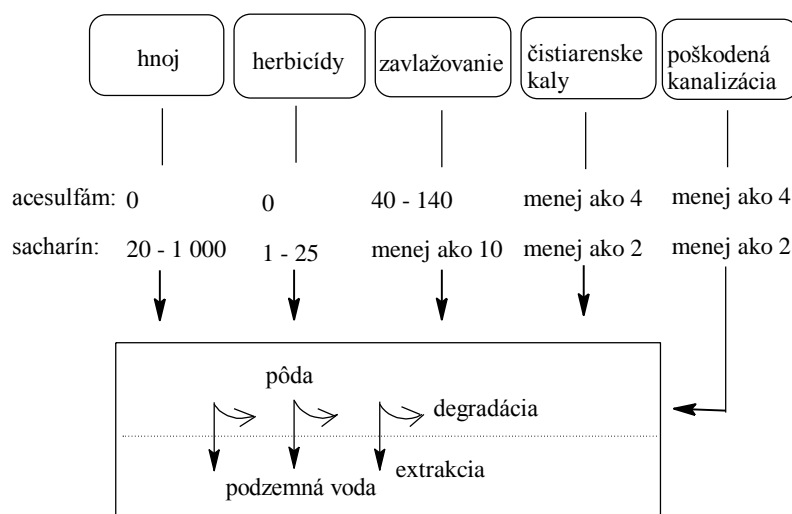
Zatiaľ čo v U.S a UK je stále cyklamát zakázaný, v 50 (niektoré zdroje uvádzajú 90) krajinách je bežne používaný. Predtým ako bol v U.S. zakázaný, bol používaný ako stolné

sladidlo v rozličných jedlách a nápojoch a taktiež v liekoch v tabletovej ale aj tekutej podobe. Dnes je vo viac než päťdesiatich krajinách využívaný v mnohých produktoch ako stolné sladidlo, v ovocných nápojoch a džúsoch, konzervovanom ovocí, žuvačkách, šalátových dressingoch, či v želatínach a podobne. Hodnota ADI pre cyklamát bola stanovená na 0 – 11 mg/kg telesnej váhy [1, 9]. Jeho medzinárodné označenie je E952 [12].

2.2 Umelé sladidlá v životnom prostredí

2.2.1 Prítomnosť umelých sladidiel v pôde

Umelé sladidlá sú konzumované v značnom množstve ako náhrada cukru v nízkokalorických jedlách alebo nápojoch a ukázalo sa, že sú všadeprítomné vo vodnom prostredí. Taktiež sa môžu však umelé sladidlá objaviť v pôde a to prostredníctvom niekoľkých ciest, ktoré názorne zobrazuje nasledujúci obrázok [17].



Obr. 2.2.1.1 Vstupné cesty umelých sladidiel do pôdy a následne do podzemnej vody. Odhadovaný ročný prísun acesulfámu a sacharínu do pôdy v jednotkách g/ha [17].

Odpadová znečistená povrchová voda môže byť použitá na zavlažovanie poľnohospodárskych polí. V niektorých krajinách sú čistiarenské kaly používané v poľnohospodárstve tiež na hnojenie. Okrem toho neprečistená odpadová voda môže presakovať do pôdy cez poškodené kanalizačné potrubie. Nielen ľudská konzumácia je jediným zdrojom sladidiel v životnom prostredí. V mnohých krajinách je sacharín registrovaný ako prídavná látka do krmiva pre ošípané, a teda použitím takéhoto hnojiva sa môže dostať toto

sladidlo do poľnohospodárskej pôdy. Sacharín je tiež hlavným pôdnym metabolitom niektorých sulfonylmočovínových herbicídov [17].

V laboratórnom výskume Buergera, Kellera a spol. zameranom na degradáciu sladidiel v ornej pôde bolo zistené, že cyklamát, sacharín, acesulfám K a aj sukralóza sú v pôde degradované. Rýchla degradácia cyklamátu a sacharínu v ornej pôde je zhodná s rozsiahlou elimináciou pozorovanou v čistiarniach odpadových vôd ($\approx 99\%$ pre cyklamát a $\approx 90\%$ pre sacharín). Pre acesulfám a sukralózu pomerne rýchla degradácia je v kontraste s ich pretrvávaním a stálosťou v čistiarniach odpadových vôd. Môže to byť odôvodnené prítomnosťou iných mikrobiálnych komunit a to predovšetkým kvasiniek a húb. Hoci nie je možné s určitosťou tvrdiť, že práve tieto organizmy sa podieľajú na degradácii sladidiel, z výskumu jasne vyplýva, že biodegradácia sladidiel je možná. Polčasy života pre jednotlivé sladidlá boli nasledovné: 0,3 – 6 dní pre cyklamát, 3 – 12 dní pre sacharín, 3 – 49 dní pre acesulfám a 8 – 124 dní pre sukralózu [17].

V spomínanom výskume bolo predmetom ďalšieho štúdia tiež degradácia sladidiel v pôdnom podloží. Biodegradačné hodnoty zvyčajne klesajú s hĺbkou pôdy v dôsledku zníženia biologickej aktivity. Rozložiteľnosť umelých sladidiel bola skúmaná v experimente s využitím metódy lúženia, kde neprečistená odpadová voda presakovala materiálom z pôdneho podložia počas 57 dní. Výsledky dokazujú, že cyklamát a sacharín sú degradovateľné v životnom prostredí. Acesulfám a sukralóza sú na druhej strane v životnom prostredí značne stabilné [17].

2.2.2 Výskyt umelých sladidiel vo vode

Umelé nízkokalorické sladidlá sú konzumované v značnom množstve v jedlách a nápojoch. Po konzumácii sú tieto sladidlá vylučované prostredníctvom moču a stolice viac menej metabolicky nezmenené, a tým sa stávajú tieto sladidlá úzko spojené so životným prostredím [18]. Nedávne štúdie dokázali, že niektoré sladidlá sú detekovateľné v mestskej odpadovej vode a rozličných vodách životného prostredia. Umelé sladidlá sú všeobecne považované ako málo ekotoxické. Avšak je teoreticky možné, že umelé sladidlo sukralóza môže mať vplyv na ekosystém vody, pretože napodobňuje sacharózu, ktorá je biochemicky úzko spätá s rozličnými biologickými funkciami zahrňujúc fotosyntézu [19]. Podzemná voda je dôležitým zdrojom pitnej vody a vyžaduje si vysoký stupeň ochrany. Kontaminácia cudzorodými

chemikáliami a patogénnymi mikróbmi môže pochádzať z rôznych zdrojov, napríklad z poľnohospodárstva, domácností, priemyslu a tovární [18]. Môže byť ovplyvnená odpadovou vodou zo septiku, presakujúcou kanalizáciou alebo z kalojemov. Takto znečistená podzemná voda môže ovplyvniť pramene pitnej vody, alebo výrazne prispieť k výskytu kontaminantov v mestských potokoch [19].

Z dôvodu práve spomínanej kontaminácie vody umelými sladidlami viaceré štúdie sa zamerali na ich výskyt v podzemných vodách, mestských potokoch či v čističkách odpadových vôd. Štyri sladidlá, acesulám, sukralóza, sacharín a cyklamát, boli dôkladne detekované v domácej odpadovej vode v koncentrácii niekoľkých $\mu\text{g/l}$ [17].

Buerge a spol. v roku 2009 zistili, že v neprečistenej odpadovej vode boli dôsledne detekované štyri umelé sladidlá v koncentrácii od 2 – 65 $\mu\text{g/l}$ v poradí cyklamát \approx acesulfám $>$ sacharín $>$ sukralóza. V už prečistenej odpadovej vode koncentrácia a množstvo acesulfámu a sukralózy boli porovnateľné s hodnotami v neprečistenej odpadovej vode. Zatiaľ čo cyklamát a sacharín boli nájdené v značne nižšom množstve, ktoré korešpondovalo s účinnosťou eliminácie 99 % pre cyklamát a 90 % pre sacharín [18]. Zdá sa, že cyklamát a sacharín sa ochotne biologicky rozkladajú, avšak sú stále detekovateľné aj v prečistenej vode [17, 19]. Vzhľadom na nekompletnú elimináciu v čističiarňach odpadových vôd sa tieto sladidlá dostávajú ďalej do riek a mestských potokov, kde je voda z čističiek vypúšťaná [3].

Výskyt spomínaných sladidiel bol zaznamenaný aj v povrchových vodách. Vo všeobecnosti koncentrácia sladidiel stúpa s populáciou (P) a klesá so stredným prietokom vody (Q, $\text{m}^3/\text{deň}$). Buerge a spol. vo svojom výskume preukázali lineárnu koreláciu medzi koncentraciou jednotlivých sladidiel a pomerom P/ Q, čo naznačuje, že sladidlá odrážajú kontamináciu povrchových vôd domácou odpadovou vodou nie iba v kvalitatívnom, ale aj kvantitatívnom zmysle [18]. Dokonca sukralóza bola tiež detekovaná v prímorskej a oceánskej vode na juhu Spojených štátov [19].

Zo štyroch umelých sladidiel detekovaných v podzemnej vode bol najviac rozšírený výskyt acesulfámu a v niektorých prípadoch dokonca vo vysokej koncentrácii. Buerge a spol. uvádzajú, že acesulfám sa vyskytol v 65 prípadoch zo 100 v koncentrácii vyššej ako 4,7 $\mu\text{g/l}$. Prítomnosť acesulfámu v podzemných vodách môže byť dôkazom infiltrácie prečistenej odpadovej vody cez povrchové vody (nepriamy vstup), alebo infiltráciu neprečistenej odpadovej

vody z poškodenej kanalizácie (priamy vstup). V najnovšom výskume Stempvoorta a spol. bola možná kontaminácia z prečistenej odpadovej vody vyvrátená a práve naopak podpovrchová voda je primárnym zdrojom acesulfámu v riekach. V tomto výskume bola dokázaná taktiež prítomnosť sacharínu a cyklamátu, čo je v kontraste s predošlými štúdiami v Európe (Buerge a spol., 2009; Scheurer a spol., 2009), kde sa tieto sladidlá nenašli v žiadnych vzorkách. Prítomnosť sacharínu a cyklamátu v relatívne vysokej koncentrácii v podzemných vodách poukazuje na vplyv podmienok v podzemných vodách na biodegradačné procesy, ktoré môžu byť limitované alebo inhibované. Rovnako má pravdepodobne vplyv na relatívnu hojnosť týchto alebo iných sladidiel tiež ich historické a dnešné používanie [18, 19].

Ideálnym ukazovateľom znečistenia by mal byť konkrétny zdroj vypustený do životného prostredia v postačujúcej kvantite, mal by odrážať kontamináciu v kvantitatívnom zmysle a mal by byť prístupný rýchlej a citlivej analýze. Štúdie preukázali, že acesulfám spĺňa všetky kritériá, aby sa mohol stať ideálnym ukazovateľom odpadovej vody z domácností v životnom prostredí zahrňujúc povrchové a podzemné vody. Korelácia medzi koncentraciou v povrchových vodách a aktuálnou antropogénnou záťažou naznačuje, že acesulfám kvantitatívne odráža znečistenie životného prostredia odpadovou vodou. Vzhľadom na detekciu aj iných sladidiel ako acesulfámu v podzemných vodách, môže byť použitie analýzy viacerých sladidiel spolu užitočné pri dokazovaní rozličných zdrojov, ktoré ovplyvňujú kvalitu podzemnej vody, k získaniu kľúčových parametrov ako blízkosť zdroja a dobu zadržania podzemnej vody a rovnako môže napomôcť k identifikácii zdrojov znečistenia, ktoré nie sú odpadovou vodou [18, 19].

2.3 Biologické účinky umelých sladidiel

Rozsiahle používanie a čoraz väčší nárast v používaní umelých sladidiel vedú k čoraz častejším diskusiám o ich zdravotnej nezávadnosti a prípadných rizikách, ktoré ich používanie môže spôsobiť.

2.3.1 Vplyv umelých sladidiel na vznik rakoviny

Podiel umelých sladidiel na vzniku rakoviny je predmetom rozsiahlych debát od roku 1970, keď výskum na zvieratách preukázal zvýšené riziko vzniku rakoviny močového mechúra

u hlodavcov, ktoré boli kŕmené veľmi vysokými dávkami sacharínu [20]. Správa D. L. Arnolda z roku 1983 uvádza, že na základe dvojgeneračnej štúdie bolo jasne dokázané, že keď bola potkanom od počatia až do smrti podávaná strava s obsahom 5 % alebo 7,5 % sacharínu, objavila sa zvýšená početnosť vzniku rakoviny močového mechúra a to hlavne u samcov [6]. M. M. Andreatta a spol. na základe ich vlastnej práce a rovnako aj iných prác skonštatovali, že sacharín, cyklamát a aspartám môžu byť spojené so vznikom tumorov močového mechúra cez oba mechanizmy: podpora – ak je bujnenie sliznice zvýšené – a chronické dráždenie – ak sú umelé sladidlá konzumované už dlhú dobu počas života [21].

V Taliansku sa C. Bosetti a spol. zamerali na vplyv umelých sladidiel na vznik rakoviny žalúdka, pankreasu a endometria: u 230 pacientov s potvrdenou rakovinou žalúdka a 547 kontrol, u 326 pacientov s rakovinou pankreasu a korešpondujúcich 652 kontrol, u 454 pacientov s rakovinou endometria a 908 kontrol. Výsledky tejto štúdie ukázali, že konzumácia umelých sladidiel nie je spojená s rizikom vzniku rakoviny žalúdka, pankreasu a endometria [20].

V súlade so súčasnou literatúrou pravdepodobný risk vyvolania rakoviny umelými sladidlami sa zdá byť zanedbateľný [15].

2.3.2 Zvyšovanie telesnej hmotnosti vplyvom umelých sladidiel

Umelé sladidlá sú značne používané v celom svete a niektoré epidemiologické štúdie preukázali spojenie medzi užívaním umelých sladidiel a zvyšovaním telesnej hmotnosti. Vplyv umelých sladidiel na zmeny v telesnej hmotnosti, zmeny v príjme stravy a tekutín bol predmetom výskumu Polyáka a spol. na 30 myších samičkách a 30 samcoch, ktorí boli kŕmení vodnými roztokmi obsahujúcimi stolné sladidlá. Z výsledkov vyplýva, že samcom myší, ktorým boli podávané sladidlá cyklamát a sacharín podstatne pribrali počas štúdia oproti kontrolnej skupine, ktorej bola podávaná iba čistá voda. Rovnaký výsledok sa objavil aj v skupine samičiek kŕmených sacharínom. Samce aj samičky značne nabrali na váhe, aj keď sa ich stravovacie zvyky nezmenili. V prípade myší kŕmených roztokom aspartámu a acesulfámu K sa ich váha nezmenila. Zatiaľ čo nebola zaznamenaná zmena v stravovaní u myší kŕmených aspartámom, samičky kŕmené acesulfámom K značne znížili príjem jedla a naopak u samcov sa zvýšil príjem tekutín [22]. Taktiež ďalší výskum Martíneza a spol. na laboratórnych potkanoch kŕmených rôznymi sladidlami ukázal, že po 73 dňoch finálny nárast váhy bol v skupinách v zostupnom

poradí nasledovný: skupina kĺmená fruktózou > aspartámom > sukralózou > v kontrolnej skupine > sacharózou [23].

Umelé sladidlá si získali pozornosť ako diétne nástroje, ktoré poskytujú sladkú chuť bez prísunu energie z jedál a nápojov, ktoré obsahujú kalorický cukor, a teda môžu asistovať v dietetickom pláne. Blum a spol. skúmali konzumáciu nápojov sladených umelými sladidlami a BMI na 164 deťoch zo základných škôl. Táto dlhotrvajúca štúdia ukázala, že zvýšená konzumácia diétnych sód pozitívne korelovala so zvýšením BMI po dvoch rokoch. Porovnateľné výsledky ukázali aj štúdie Berkey a spol., ktorí skúmali vzťah medzi BMI a konzumáciou diétnych sód medzi 10 000 deťmi vo veku od 9 do 14 rokov [24].

Avšak náhodné intervenčné štúdie u obéznych jedincov ukázali, že používanie umelých sladidiel môže zvýšiť dodržiavanie nízkokalorickej diéty, a tým znížiť príjem energie, znížiť váhu a zlepšiť chudnutie. Deväť náhodných klinických štúdií u obéznych ľudí, ktoré analyzovali informácie o zmene váhy u týchto jedincov ukázali značne väčšiu stratu váhy u používateľov umelých sladidiel v porovnaní s tými, ktorí umelé sladidlá nepoužívajú. Taktiež aj zistenia S. Phelena a spol. sú viac v súlade so spomínanými štúdiami a svedčia o tom, že používanie nápojov obsahujúcich umelé sladidlá môže byť dôležitou súčasťou stratégie ľudí, ktorí sa pokúšajú schudnúť [25].

2.3.3 Účinok umelých sladidiel na gastrointestinálny trakt

Konzumácia nápojov obsahujúcich umelé sladidlá je bežný zvyk u detí aj dospelých. Všeobecne sa predpokladá, že metabolizmus glukózy sa po ich konzumácii nezmení, pretože tieto nápoje neobsahujú, alebo obsahujú veľmi málo kalórií. Avšak nedávne štúdie na zvieratách dokázali, že umelé sladidlá hrajú aktívnu metabolickú rolu v gastrointestinálnom trakte [26].

Chuťové receptory pre sladkú chuť reagujú nielen na kalorické cukry ako sacharóza, ale tiež na umelé sladidlá (sukralóza, acesulfám K). U zvierat a aj u ľudí sa ukázalo, že tieto receptory nie sú prítomné len v chuťových pohárikoch na jazyku, ale tiež aj v L - bunkách črevnej mukózy, ktoré vylučujú glukagónu podobný peptid – 1 (GLP - 1), a kde slúžia ako rozhodujúce mediátory sekrécie GLP – 1. Rebecca J. Brown a spol. v svojej práci na mladých zdravých dobrovoľníkoch zistili, že konzumácia diétnych nápojov pred orálne podávaným

glukózovým testom znásobila sekréciu GLP – 1, teda môže zmeniť ako žalúdočné vyprázdňovanie, tak aj sekréciu inzulínu. Z čoho vyplýva, že konzumáciou umelých sladidiel v spojení s jedlom obsahujúcim cukor, alebo so sladenými nápojmi, môže viesť k rýchlejšej absorpcii cukru, ako aj k zvýšenej sekrécii GLP – 1 a inzulínu a eventuálnemu ovplyvneniu hmotnosti, apetítu a glykémie [24, 26].

V štúdií Jing Ma a spol., ktorí sa tiež zaoberali vplyvom umelého sladidla sukralózy na žalúdočné vyprázdňovanie a sekréciu gastrointestinálnych hormónov u siedmych zdravých osôb však zistili, že sukralóza podávaná žalúdočnou infúziou nemala žiadny efekt na sekréciu GLP – 1, sekréciu inzulínu alebo žalúdočné vyprázdňovanie. Zatiaľ čo práve prítomnosť uhl'ohydrátov v tenkom čreve je preukázaným stimulom k sekrécii gastrointestinálnych hormónov [27].

2.3.4 Poškodenie mozgu ako dôsledok užívania umelých sladidiel

Niektoré štúdie poukazujú na nepriaznivý vplyv aspartámu na centrálny nervový systém tým, že jeho nadmerná konzumácia môže spôsobovať poškodenie mozgu. Aspartám je zložený z fenylalanínu, kyseliny asparágovej a metanolu. V minulosti bolo publikované, že konzumácia aspartámu môže spôsobiť neurologické poruchy a poruchy v správaní u senzitívnych jedincov. Bolesť hlavy, nespavosť a záchvaty sú niektoré z neurologických porúch, ktoré sa môžu vyskytnúť a môže to byť pripísané zmenám koncentrácie katecholamínov v centrálnom mozgu, ktoré sú dôležitými neurotransmitermi regulujúcimi životne dôležité funkcie [28].

Fenylalanín, ktorý je súčasťou aspartámu, môže spôsobiť vážne problémy ľuďom trpiacim genetickou poruchou – fenylketonúriou, pretože nedokážu metabolizovať práve fenylalanín, čo vedie k nebezpečne vysokej hladine fenylalanínu v mozgu. Dôsledkom čoho môže byť znížená hladina serotonínu v mozgu vedúca k emocionálnym poruchám ako napríklad k depresiám. V publikácii Dr. J Barua a Dr. A Bala sa uvádza výskum Roberta z roku 1988, ktorý na 551 osobách skúmal reakcie na aspartám a až 45 % osôb uvádzalo bolesť hlavy, 39 % osôb uviedlo závraty, poruchy rovnováhy alebo oboje a 29 % osôb sa sťažovalo na zmätenosť, stratu pamäti alebo obe poruchy [29].

2.4 Fytoremediačné techniky

Rozsiahle oblasti podzemných vôd a pôd v rozličných častiach sveta sú kontaminované priemyselnými, vojenskými a poľnohospodárskymi aktivitami. Zvyšovanie toxických polutantov (kovov, rádionuklidov a organických kontaminantov v pôde, povrchovej vode a podzemnej vode) nielenže ovplyvňuje prírodné zdroje, ale tiež vyvíja veľký tlak na ekosystém [30].

Fytoremediácia je všeobecný pojem pre niekoľko spôsobov, v ktorých sú rastliny použité na sanáciu lokalít tým, že odstraňujú znečisťujúce látky z pôdy a vody. Rastliny, a s nimi súvisiace mikróby, môžu degradovať organické kontaminanty, alebo zadržať či stabilizovať kovové kontaminanty tým, že sa správajú ako filtre alebo eliminátory. Fytoremediácia je v posledných rokoch považovaná za cenovo výhodnú, neinvazívnu alternatívnu alebo doplnujúcu technológiu pre technicky založené sanačné metódy. Rastliny môžu byť použité pre stabilizáciu polutantov, extrakciu, degradáciu a volatilizáciu [30 – 33].

Fytoremediačné aplikácie môžu byť klasifikované na základe osudu znečisťujúcej látky: degradácia, extrakcia, obmedzenie alebo ako ich kombinácie. Avšak môžu byť tiež klasifikované na základe príslušných mechanizmov. Ako mechanizmus zahrňujúci extrakciu kontaminantov z pôdy alebo vody, koncentráciu kontaminantov v rastlinných pletivách, degradáciu kontaminantov rôznymi biotickými alebo abiotickými procesmi, volatilizáciu alebo odparenie prchavých kontaminantov z rastliny do vzduchu, imobilizáciu kontaminantov v koreňovej oblasti [30].

Medzi základné fytoremediačné techniky patria:

- *fytoextrakcia* – alebo tiež *fytoakumulácia*, je proces, v ktorom dochádza k absorpcii a premiestneniu kovových kontaminantov z pôdy prostredníctvom koreňov rastlín do nadzemných častí rastlín (stoniek a listov). Niektoré rastliny nazývané tiež *hyperakumulátory* absorbujú zväčša väčšie množstvo kovov ako iné rastliny. Jeden druh alebo kombinácia týchto druhov rastlín je starostlivo vybraná a zasadená na miesta podľa druhu prítomných kovov a tiež ďalších miestnych podmienok. Po niekoľkých týždňoch či mesiacoch sú tieto rastliny zozbierané a buď spálené alebo zkompostované a ďalej využité na získanie pôvodných kovov z rastliny. Tento fytoakumulačný proces môže byť opakovaný až dovtedy, kým hladina kontaminantov nedosiahne limitujúce hodnoty [30 – 33].

- *rhizofiltrácia* – je proces adsorpcie alebo vyzrážania kontaminujúcich látok na rastlinných koreňoch, alebo absorpcie v koreňoch, ktoré obklopuje voda. Rastliny môžu, alebo nemusia prijať a premiestniť kontaminant. Táto látka môže byť prijatá, imobilizovaná alebo akumulovaná v alebo na koreňovej štruktúre. Rastliny používané na vyčistenie zamorenej oblasti sú pestované v skleníkoch prevažne vo vode než v pôde. Rastliny sú potom zasadené do kontaminovaného prostredia a koreňový systém prijíma vodu spolu s polutantmi. Keď sú korene nasýtené týmito látkami, sú ďalej zozbierané a buď spálené, alebo kompostované. Taktiež je možné z nich opäť získať kontaminujúce látky späť. Tento proces je výrazne závislý na hodnote pH vody [30 – 33].

- *fytoštabilizácia* – využíva niektoré rastlinné druhy na imobilizáciu kontaminantov v pôde a v podzemnej vode pomocou ich absorpcie a akumulácie koreňmi, adsorpcie na koreňoch, alebo zadržiavaním v koreňovej oblasti. Tento proces redukuje mobilitu kontaminantov a predchádza ich migrácii do podzemnej vody alebo vzduchu. Fytoštabilizácia je využiteľná aj na obnovenie vegetačného krytu na miestach, kde je prirodzená vegetácia v nedostatku v dôsledku vysokej kontaminácie kovmi v pôdach. Rastlinné druhy tolerantné na kov môžu byť použité na obnovenie vegetácie, a týmto spôsobom znížiť potenciálnu migráciu kontaminantov počas veternej erózie, transport nechránenej povrchovej pôdy a lúhovanie pôdnych kontaminantov do podzemnej vody [30 – 32].

- *fytoštransformácia* – tiež nazývaná fytošdegradácia, je rozklad kontaminantov metabolickou aktivitou rastlín, alebo rozklad kontaminantov mimo rastliny uvoľnenými enzýmami produkovanými rastlinami, čoho dôsledkom je vznik iných látok. Pri fytošdegradácii je treba zaistiť, aby nedochádzalo k premenám na metabolity, ktoré sú toxickejšie ako samotný polutant [30 – 32].

- *fytošvolatilizácia* – je absorpcia a vyparovanie kontaminantu rastlinou s uvoľnením tejto látky, alebo jej modifikovanej formy do atmosféry z rastliny. Fytošvolatilizácia sa objavuje keď rastúce stromy a iné rastliny nasávajú vodu a iné organické znečisťujúce látky. Niektoré z týchto látok prechádzajú cez rastlinu až do listov a vyparujú sa do atmosféry v značne menšej koncentrácii [30 – 32].

- *rhizodegradácia* – nazývaná tiež ako fytostimulácia, posilnená rhizosféra biodegradácia, rastlinami uľahčená bioremediácia / degradácia. Rhizosféra, alebo pôda jeden milimeter od rastlinných koreňov, je dynamické a zložité komplexné prostredie. Zvýšená mikrobiálna aktivita a biomasa v tejto oblasti, kde dochádza k vzájomnému ovplyvňovaniu mikróbov s rastlinami, sa stala známou ako „rhizosféry efekt“ a je rozhodujúca pre rhizosféru bioremediáciu výrazne zvyšujúcu počet mikróbov a metabolickú aktivitu, a tiež zvyšujúcu degradáciu kontaminantov a dostupnosť látok pre absorpciu koreňmi. Mikroorganizmy (kvasinky, huby, baktérie) konzumujú a trávia organické látky, ktoré využívajú na získanie energie a výživy. Niektoré mikroorganizmy môžu tráviť aj organické látky ako palivo alebo rozpúšťadlá, ktoré sú nebezpečné pre človeka, a rozkladajú ich na neškodné produkty v biodegradačnom procese. Prírodné látky uvoľnené rastlinnými koreňmi – cukry, alkoholy a kyseliny – obsahujú organický uhlík, ktorý poskytuje stravu pre pôdne mikroorganizmy a ďalšie živiny zvyšujú ich aktivitu [30 – 32].

3 Experimentálna časť

3.1 Použité chemikálie

Pri práci boli použité nasledujúce chemikálie: acesulfám K (čistota ≥ 99 % (HPLC), Sigma – Aldrich), sodná soľ sacharínu hydrát (čistota ≥ 99 %, Sigma – Aldrich), *N*-cyklohexylsulfamát sodný (čistota ≥ 99 %, Sigma – Aldrich), sacharóza (čistota p.a., Lachema ČR), myo-inositol (kvalita pre tkaninové kultúry, Sigma – Aldrich), demineralizovaná voda (Demiva 3roi., Watek ČR), chemikálie použité na prípravu kultivačných médií boli v čistote p.a., metanol pre HPLC (Lab-Scan), kyselina octová (čistota p.a., Merck), kyselina trihydrogénfosforečná (čistota p.a., Merck), dihydrogénfosforečnan draselný (čistota p.a., Lachema ČR), Savo (Bochemie a.s.), etanol (96 %, denaturovaný benzínom).

3.2 Prístroje

Na analýzu odobratých vzoriek bol použitý kvapalinový chromatograf INCOS (ČR) tvorený: vysokotlakovým čerpadlom INCOS LPC 5020, autosamplerom INCOS LCS 5040, UV detektorom INCOS LCS 5000, kolónou so sorbentom Reprosil 100 C-18 (5 μ m) o rozmere 4,4 x 250 mm (Watrex). Namerané dáta boli ďalej vyhodnocované v chromatografickom programe Clarity (DataApex) s automatickým prepočtom podľa nameranej kalibračnej závislosti, pričom medza detekcie bola 0,05 mg/l.

Na prípravu kultivačného média, rastlín a ku samotnej kultivácii boli použité nasledujúce prístroje: pH-meter (IQ, Scientific Instruments, USA), magnetická miešačka IKA-basic (IKA, SRN), laminárny box BHLS (Labox, ČR), kultivačné boxy TCH 100 9 (Laboratórne prístroje, Praha).

3.3 Rastliny využívané na experiment

Na fytoextrakciu umelých sladidiel boli použité semená nasledujúcich rastlín:

- Kukurica siata (*Zea mays*) cv. DKC2971 G1, cv. 070062 A
- Repka olejná (*Brassica napus*) cv. Cadeli, cv. Exocet
- Slničnica ročná (*Helianthus annuus*) cv. Belem, cv. Extrasol

Všetky použité kultivary boli získané od firmy MONSANTO ČR s.r.o.

3.4 Pracovný postup

3.4.1 Príprava rastlinných kultúr

Ako živná pôda pre rastlinné kultúry bolo použité médium podľa Murashigea a Skooga s prídavkom myo-inositolu (100 mg/l) [34]. Výsledné pH média bolo upravené na hodnotu 5,8. Následne 10 ml alebo 15 ml média bolo nadávkované do 250 alebo 500 ml Erlenmeyerových bánk, ktoré boli následne uzatvorené alumíniovou fóliou a sterilizované. Semená rastlín boli ešte pred nasadením do živného média sterilizované a odmastené v 70% roztoku etanolu po dobu 30 sekúnd. Potom bol etanol zo semien vyliaty a sterilizácia pokračovala s 10% roztokom Sava po dobu 20 minút, opätovným vyliatím Sava a s 20% roztokom Sava po dobu 10 minút. Po ukončení procesu sterilizácie a odmasťovania bolo už za aseptických podmienok v laminárnom boxe Savo zo semien vyliate a ďalej boli semená trikrát opláchnuté sterilnou destilovanou vodou. Semená repky olejnej boli pomocou sterilnej lyžičky v množstve 8 – 10 semien vnesené do 100 ml pripravených sterilných Erlenmeyerových bánk obsahujúcich kultivačné médium. Do pripravených sterilných Erlenmeyerových bánk s médiom o objeme 250 ml boli vnesené pomocou sterilnej pinzety semená slnečnice ročnej alebo kukurice siatej v množstve 4 kusy. Hrdlá Erlenmeyerových bánk boli za aseptických podmienok uzatvorené pomocou alumínovej fólie. Následne boli takto vysadené semená umiestnené do kultivačných boxov, kde ich kultivácia prebiehala po dobu troch týždňov pri teplote 25 °C. Pri nedostatku média počas kultivácie v bankách bolo toto médium opäť za sterilných podmienok doplnené.

Pri experimente bolo použité aj živné médium, ktoré sa pripravovalo rovnakým spôsobom ako už spomínané médium, avšak neobsahovalo sacharózu.

3.4.2 Fytoextrakcia umelých sladidiel

Po troch týždňoch kultivácie boli vybrané rastlinné kultúry, ktoré boli dostatočne vyrastené a neboli kontaminované. V laminárnom boxe bol za podmienok aseptickkej práce do médií s rovnakým zložením, ako bolo médium v rastlinných kultúrach, pridaný roztok umelého sladidla (sacharínu, cyklamátu, alebo acesulfámu K), pripraveného rozpustením požadovaného sladidla v sterilnej destilovanej vode pri laboratórnej teplote v takom množstve, aby výsledná koncentrácia umelého sladidla v médiu dosahovala 15 mg/l. V laminárnom boxe bolo opäť za dodržania podmienok aseptickkej práce z rastlinných kultúr vyliate zostávajúce médium z kultivácie a bolo nahradené médiom obsahujúcim umelé sladidlo. Následne na to bolo pomocou sterilnej ihly do mikroskúmaviek odobrané 0,4 ml vzorky média z každej rastlinnej kultúry. Banky s rastlinami boli opäť uzatvorené alumíniovou fóliou a ponechané v kultivačných boxoch. Odber vzoriek sa opakoval za rovnakých podmienok počas ďalších štyroch nasledujúcich dní. Vzorky z každého dňa boli uchované v mrazničke pre nasledujúcu analýzu, alebo boli hneď využité k analýze použitím HPLC s UV detekciou. V posledný deň odberu vzoriek boli na záver rastlinné kultúry osušené a zvážené.

Tab. 3.4.2.1 Separčné podmienky pre meranie acesulfámu K a sacharínu v 0,4 ml odobratých vzorkách kultivačného média.

účinná látka	zloženie mobilnej fázy	prietok mobilnej fázy [ml/min]	vlnová dĺžka detekcie [nm]
Acesulfám K	MeOH : pufor ^z (8 : 92, v/v)	1	227
Sacharín	MeOH : H ₂ O (2 : 8, v/v), 0,1% CH ₃ COOH	1	244

z - zloženie puforu: 5,23 g K₂HPO₄ v 910 ml H₂O, pH 6,7 upravené H₃PO₄

4 Výsledky a diskusia

Z výsledkov viacerých štúdií vyplýva, že aj umelé sladidlá naďalej pretrvávajú v životnom prostredí v koncentrácii niekoľkých $\mu\text{g/l}$. Tým, že sú vylučované prevažne v nezmenenej forme, dostávajú sa tieto sladidlá do odpadových vôd a následne sa môžu dostať aj do podzemných vôd, či do pitnej vody, ba dokonca ich výskyt bol zaznamenaný aj v pôde. Zavlažovanie, hnojenie poľnohospodárskych pôd, presakovanie vody cez porušené kanalizačné potrubie a v neposlednom rade nedostatočné odstránenie umelých sladidiel v čistiarniach odpadových vôd sú dôkazom všadeprítomnosti týchto látok v životnom prostredí.

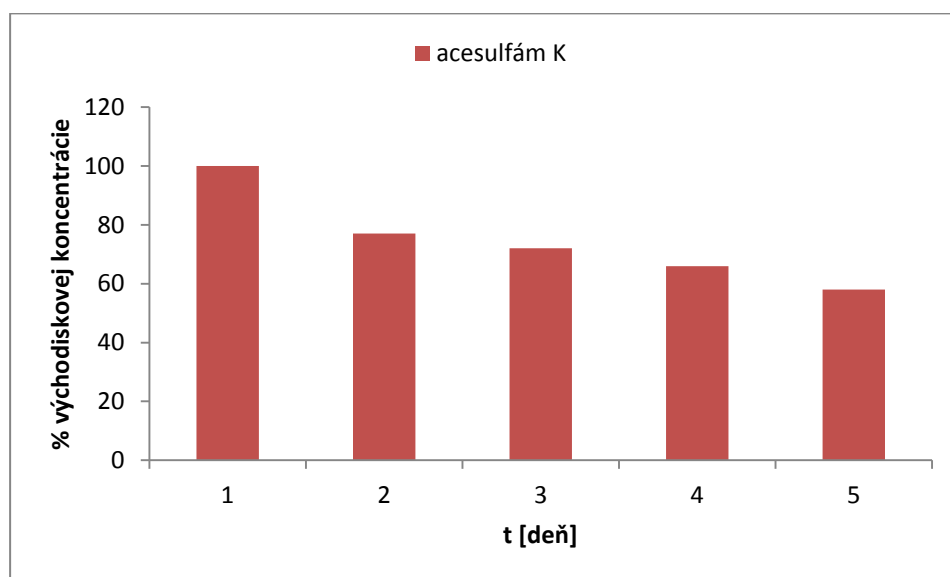
Fytoremediácia, využívanie rastlín a ich asociovaných mikrobov na očistenie životného prostredia od kontaminantov, si v posledných desiatich rokoch získala pozornosť ako neagresívna alternatívna alebo doplnujúca metóda k technicky založeným sanačným metódam. Pomocou fytoremediačných technológií je možné odstrániť anorganické i organické kontaminanty z pôdy a to už od ich nízkej koncentrácie v životnom prostredí. V posledných rokoch sa ukazuje, že tieto technológie sú využiteľné aj na odstránenie polutantov z odpadových vôd a ako doplnujúca metóda na odstránenie zostatkovej koncentrácie kontaminantov už v prečistenej odpadovej vode z čistiarní odpadových vôd.

Zatiaľ čo fytoextrakcia ťažkých kovov je dostatočne preskúmaná a využívaná, mechanizmus pôsobenia a interakcie rastlín s anorganickými kontaminantmi je známy, u fytoextrakcii organických látok je tomu naopak. V prípade organických látok sú štúdie zamerané hlavne na organické látky priemyselného využitia, či produkty farmaceutického priemyslu, avšak nedostatočná pozornosť sa venuje potravinárskym prídavným látkam, ktoré sú čoraz viac v potravinárskom priemysle využívané a ktoré sa môžu rovnako ako iné kontaminanty dostať do životného prostredia, pretrvávajú v ňom a mať negatívny vplyv či na životné prostredie tak i na človeka. Táto práca bola predovšetkým zameraná na štúdium účinnosti a možného využitia fytoextrakcie na elimináciu umelých sladidiel ako acesulfámu K, sacharínu a cyklamátu z vodného prostredia, ktoré sú hojne využívané.

4.1 Acesulfám K

Účinnosť fytoextrakcie na elimináciu umelých sladidiel z vodných roztokov bola v prípade acesulfámu K študovaná na slnečnici ročnej (*Helianthus annuus* cv. Extrasol a Belem), repke olejnej (*Brassica napus* cv. Cadeli) a kukurici siatej (*Zea mays* cv. 070062 A). Počiatočná koncentrácia acesulfámu K vo vodnom roztoku bola 15 mg/l.

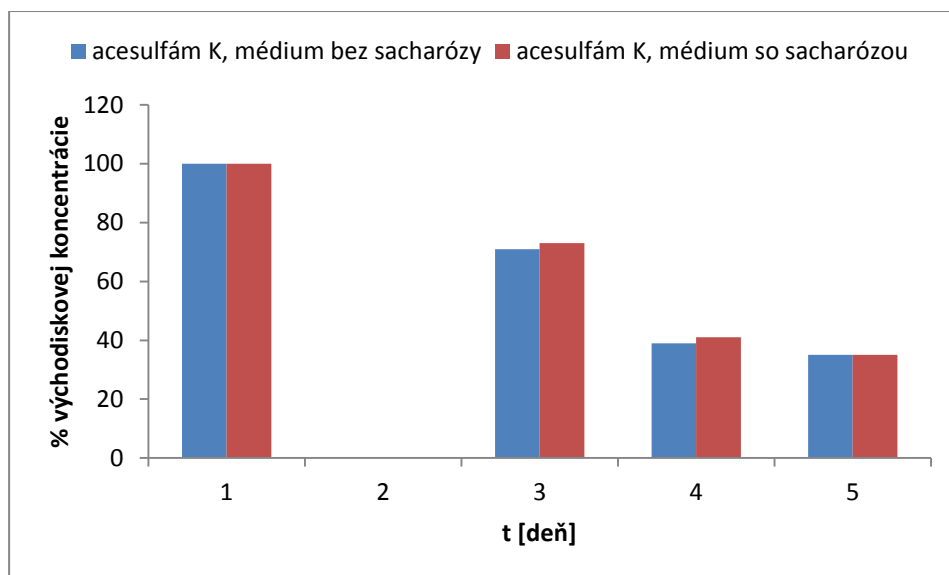
Priebeh fytoextrakcie acesulfámu K použitím slnečnice ročnej (cv. Extrasol) zobrazuje graf 4.1.1 a množstvo vyextrahovaného acesulfámu K je vyjadrené v percentách východiskovej koncentrácie. Zo získaných výsledkov je viditeľné, že aj keď v priebehu piatich dní, kedy bol priebeh fytoextrakcie sledovaný, došlo k zníženiu koncentrácie acesulfámu K, eliminácia bola len čiastočná a výsledné množstvo acesulfámu K vo vodnom roztoku bolo 58 %. Aj napriek výraznejšej eliminácii v priebehu prvých 24 hodín, rýchlosť eliminácie nezostala konštantná a jej spomalenie malo za následok pretrvávajúci výskyt acesulfámu K vo vodnom roztoku.



Graf 4.1.1 Časový priebeh „in vitro“ fytoextrakcie acesulfámu K rastlinami *Helianthus annuus* (cv. Extrasol) kultivovanými na MS médiu. Východisková koncentrácia acesulfámu K $c = 15$ mg/l, koncentrácie stanovované HPLC, výsledky sú vyjadrené ako percentá východiskovej koncentrácie pre 9 nezávislých experimentov.

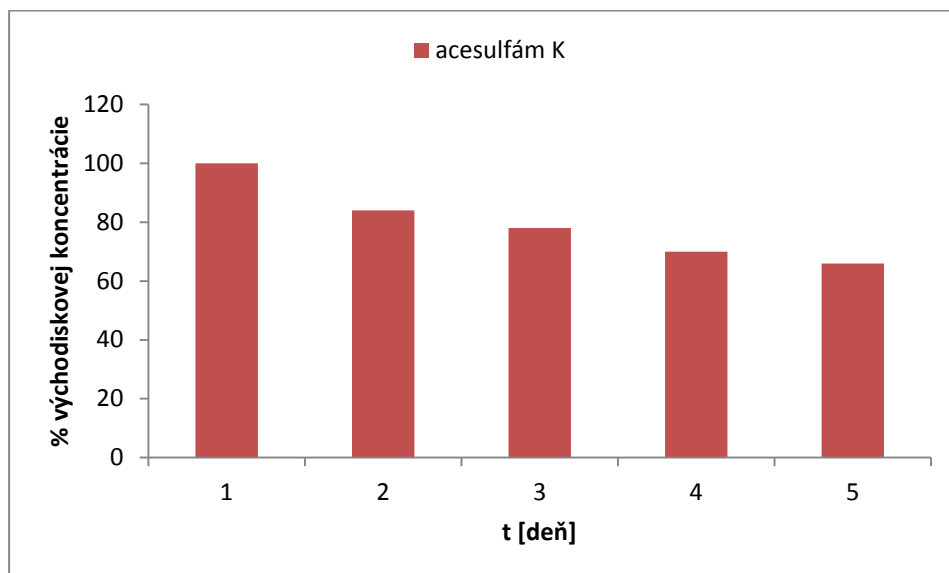
Ďalšou rastlinou využitou k fytoextrakcii acesulfámu K z vodných roztokov bola slnečnica ročná (cv. Belem). Ako živné médium bolo tento krát použité médium, ktoré buď obsahovalo sacharózu, alebo médium, ktoré sacharózu neobsahovalo. V priebehu fytoextrakcie bolo sledované, či sacharóza obsiahnutá v médiu mohla mať vplyv na priebeh a účinnosť fytoextrakcie acesulfámu K a tým potlačiť rýchlejší priebeh fytoextrakcie, alebo nie.

Z výsledkov jednoznačne vyplýva (graf 4.1.2), že zloženie média, a teda obsah sacharózy v ňom, nemá výrazný vplyv na fytoextrakciu a rýchlosť eliminácie acesulfámu K bola v oboch prípadoch rovnaká. V priebehu štyroch dní došlo k výraznému poklesu množstva acesulfámu K, a teda použitím tohto druhu rastlín bola dosiahnutá efektívnejšia fytoextrakcia acesulfámu K z vodných roztokov a výsledné množstvo, ktoré zostalo v roztoku bolo 35 % z východiskovej koncentrácie tohto umelého sladidla.



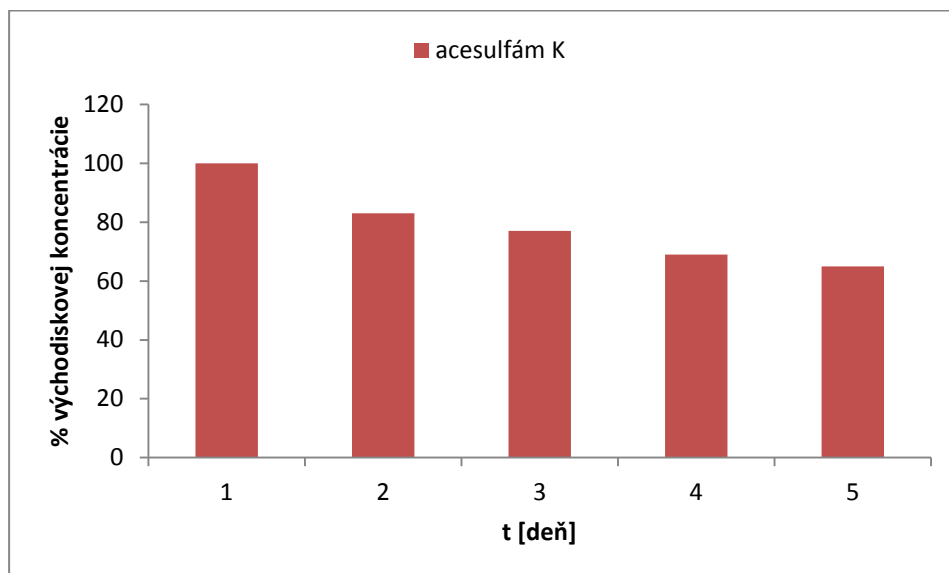
Graf 4.1.2 Časový priebeh „in vitro“ fytoextrakcie acesulfámu K rastlinami *Helianthus annuus* (cv. Belem) kultivovanými na MS médiu. Východisková koncentrácia acesulfámu K $c = 15 \text{ mg/l}$, koncentrácie stanovované HPLC, výsledky sú vyjadrené ako percentá východiskovej koncentrácie pre 13 nezávislých experimentov.

Na fytoextrakciu acesulfámu K bol tiež použitý rastlinný druh kukurica siata (cv. 070062 A). V grafe 4.1.3 je znázornený priebeh fytoextrakcie opäť v priebehu piatich dní a množstvo vyextrahovaného acesulfámu K je vyjadrené v percentách východiskovej koncentrácie. Z výsledkov vyplýva, že fytoextrakcia acesulfámu K bola len čiastočná a výsledné množstvo acesulfámu K bolo 66 %. Celkový priebeh jasne ukazuje, že rýchlosť eliminácie bola veľmi malá, čomu zodpovedajú aj výsledky z jednotlivých dní.



Graf 4.1.3 Časový priebeh „in vitro“ fytoextrakcie acesulfámu K rastlinami *Zea mays* (cv. 070062 A) kultivovanými na MS médiu. Východisková koncentrácia acesulfámu K $c = 15$ mg/l, koncentrácie stanovované HPLC, výsledky sú vyjadrené ako percentá východisková koncentrácie pre 15 nezávislých experimentov.

Graf 4.1.4 znázorňuje priebeh fytoextrakcie acesulfámu K použitím repky olejnej (cv. Cabeli), ktorá bola nasadená do média, ktoré neobsahovalo sacharózu. Ako aj v prípade kukurice siatej aj v tomto prípade bolo odstránenie sladidla len čiastočné a s podobnou rýchlosťou eliminácie ako u kukurice. Výsledky ukazujú, že už od začiatku je priebeh fytoextrakcie pomalý, čo výrazne prispieva k vysokej zostatkovej koncentrácii acesulfámu K vo vodnom roztoku. Množstvo acesulfámu K, ktoré bolo vyextrahované repkou olejnou bolo 35 % z východiskovej koncentrácie acesulfámu K.



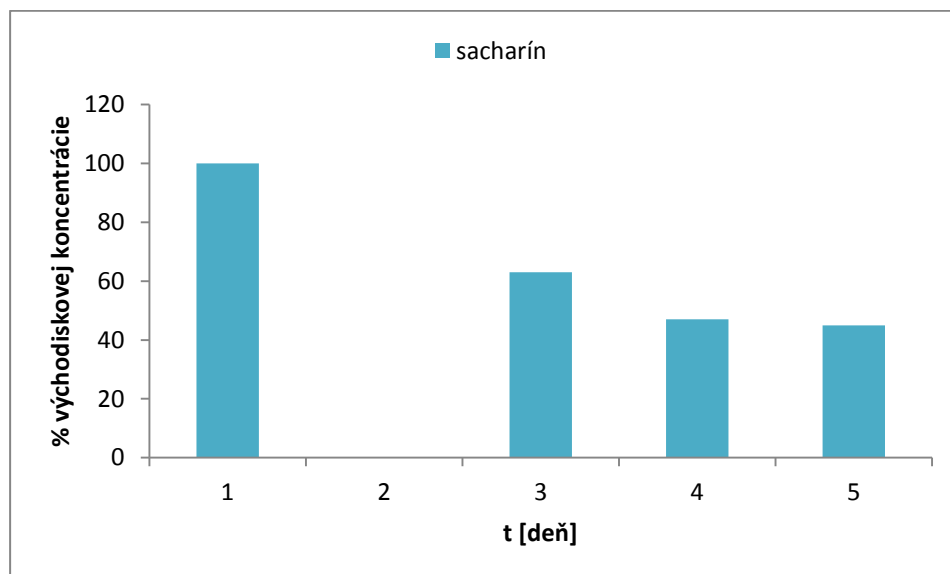
Graf 4.1.4 Časový priebeh „in vitro“ fytoextrakcie acesulfámu K rastlinami *Brassica napus* (cv. Cabeli) kultivovanými na MS médiu. Východisková koncentrácia acesulfámu K $c = 15$ mg/l, koncentrácie stanovované HPLC, výsledky sú vyjadrené ako percentá východiskovej koncentrácie pre 15 nezávislých experimentov.

Spracované údaje a dosiahnuté výsledky jasne ukazujú, že výber rastlinného druhu na fytoextrakciu skúmanej látky má výrazný vplyv na jej elimináciu. Je zrejmé, že v prípade umelého sladidla acesulfámu K bola najefektívnejšia eliminácia tejto látky dosiahnutá pri použití slnečnice ročnej. Z výsledkov je možné konštatovať, že rastliny boli schopné čiastočne extrahovať sledovanú látku, avšak ani v jednom prípade nebola dosiahnutá úplná eliminácia acesulfámu K z vodných roztokov. Fytoextrakcia nezahŕňa iba jeden jediný dej, ale je to súbor vzájomne sa ovplyvňujúcich dejov, ktoré výrazne môžu ovplyvniť výsledok. Významnú rolu hrajú hlavne adsorpčné či absorpčné deje na povrchu koreňov rastlín, metabolické a fyziologické deje, či transport látky vo vnútri rastliny. Aj napriek starostlivému výberu kultivácií, na ktorých v priebehu fytoextrakcie neboli badateľné viditeľné zmeny, je možné, že došlo k poškodeniu alebo odumretiu rastlinných tkanív, predovšetkým koreňov, čo mohlo viesť k spätočnému vypusteniu sledovanej látky z rastliny do vodných roztokov, čo v konečnom dôsledku mohlo spôsobiť pretrvávajúcu zvýšenú koncentráciu sledovanej látky v roztokoch.

4.2 Sacharín

Účinnosť fytoextrakcie sacharínu bola študovaná na rastlinných druhoch: kukurica siata (*Zea mays* cv. 070062 A a DKC2971 G1) a slnečnica ročná (*Helianthus annuus* cv. Extrasol). Počiatočná koncentrácia bola vo všetkých roztokoch 15 mg/l.

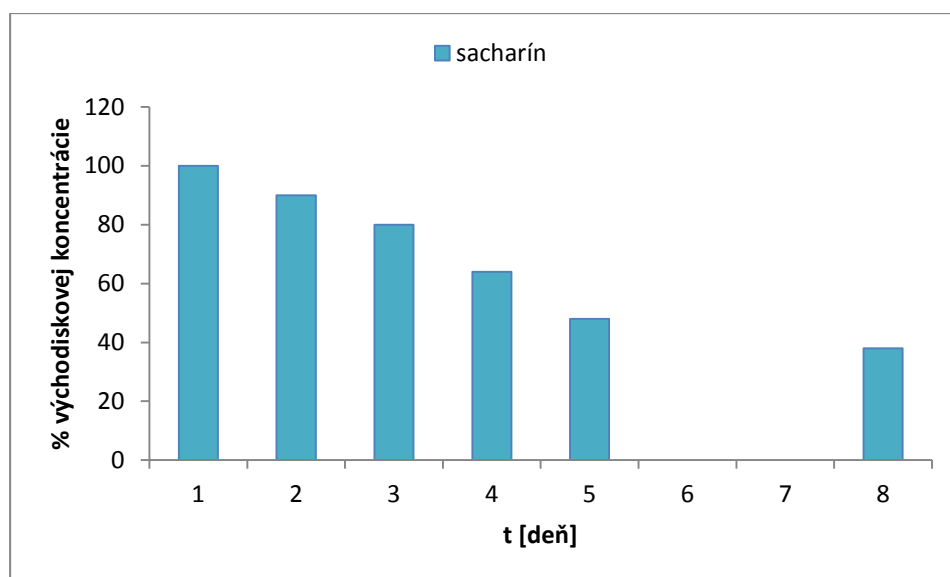
Priebeh fytoextrakcie sacharínu použitím slnečnice ročnej (cv. Extrasol) sledovaný počas piatich dní zobrazuje graf 4.2.1. Koncentrácia sacharínu v médiu v priebehu štyroch dní klesala konštantnou rýchlosťou, ale v posledných 24 hodinách sa koncentrácia sacharínu už výrazne neznižila. Zníženie rýchlosti eliminácie sacharínu mohol byť pravdepodobne dôsledok odumretia koreňov rastlín, ktoré následne opäť vypustili sacharín do média. Pokles sacharínu v médiu je vyjadrený v percentách východiskovej koncentrácie a výsledná koncentrácia sacharínu v médiu bola 45 %.



Graf 4.2.1 Časový priebeh „in vitro“ fytoextrakcie sacharínu rastlinami *Helianthus annuus* (cv. Extrasol) kultivovanými na MS médiu. Východisková koncentrácia sacharínu $c = 15 \text{ mg/l}$, koncentrácie stanovované HPLC, výsledky sú vyjadrené ako percentá východiskovej koncentrácie pre 7 nezávislých experimentov.

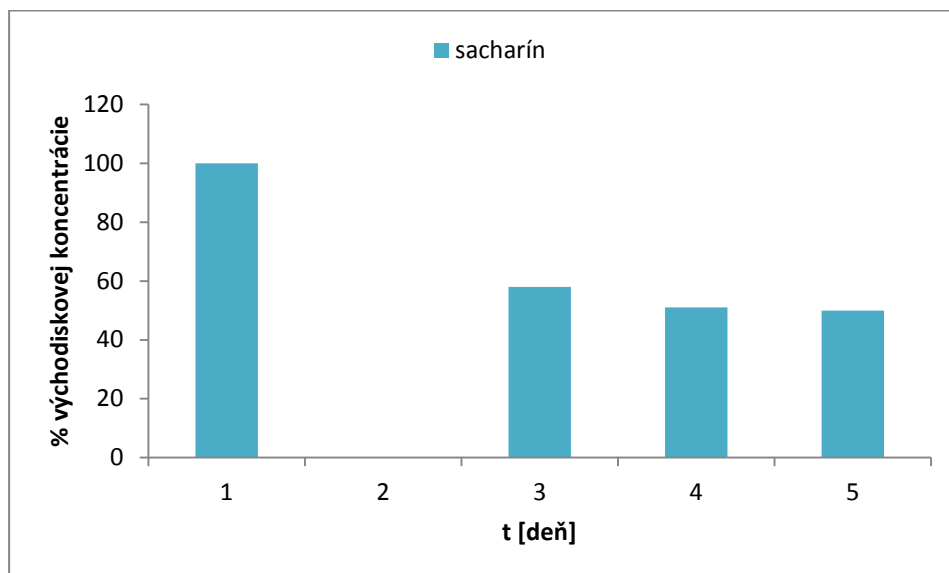
Fytoextrakcia sacharínu bola ďalej sledovaná použitím kukurice satej (cv. DKC2971 G1), avšak tento krát v priebehu ôsmich dní. Výsledky boli odoberané každý deň okrem víkendu a priebeh fytoextrakcie je zobrazený v grafe 4.2.2. Koncentrácia sacharínu v prvých piatich dňoch rovnomerne klesala. Aj keď neboli vzorky odoberané počas víkendu, dá sa predpokladať, že účinnosť fytoextrakcie postupne klesala vzhľadom k tomu, že v priebehu posledných 72 hodín koncentrácia sacharínu klesla len o 10 %. Aj napriek znižujúcej sa účinnosti fytoextrakcia

sacharínu použitím tejto odrody kukurice siatej bola úspešná na 62 % a zostatkové množstvo sacharínu v médiu bolo 38 % z východiskovej koncentrácie.



Graf 4.2.2 Časový priebeh „in vitro“ fytoextrakcie sacharínu rastlinami *Zea mays* (cv. DKC2971 G1) kultivovanými na MS médiu. Východisková koncentrácia sacharínu $c = 15 \text{ mg/l}$, koncentrácie stanovované HPLC, výsledky sú vyjadrené ako percentá východiskovej koncentrácie pre 13 nezávislých experimentov.

Okrem už spomínanej odrody kukurice, bola tiež na fytoextrakciu sacharínu použitá kukurica siata (cv. 070062 A). Výsledky zobrazené v grafe 4.2.3 ukazujú, že v priebehu prvých troch dní pôvodná koncentrácia sacharínu vo vodnom roztoku klesla až o takmer 50 % z východiskovej koncentrácie, avšak počas nasledujúcich 48 hodín sa už výrazne koncentrácia neznižovala. Je možné, že príčinou pozastavujúcej sa fytoextrakčnej schopnosti rastlín bolo odumrenie ich koreňov, čo malo za následok opätovné vypustenie sacharínu do vodného roztoku.



Graf 4.2.3 Časový priebeh „in vitro“ fytoextrakcie sacharínu rastlinami *Zea mays* (cv. 070062 A) kultivovanými na MS médiu. Východisková koncentrácia sacharínu $c = 15 \text{ mg/l}$, koncentrácie stanovované HPLC, výsledky sú vyjadrené ako percentá východiskovej koncentrácie pre 8 nezávislých experimentov.

Zo získaných výsledkov je možné konštatovať, že rastlinné druhy použité na fytoextrakciu sacharínu z vodných roztokov mali podobnú účinnosť eliminácie tohto sladidla. Vo všetkých prípadoch bola fytoextrakcia sacharínu úspešná čiastočne a počas piatich dní bolo z použitých roztokov vyextrahované približne 50 % z východiskovej koncentrácie sacharínu. Ako už bolo spomínané, fytoextrakcia je súbor viacerých dejov, ktoré na seba vplyvajú, a preto nie je vylúčené, že nižšia účinnosť fytoextrakcie mohla byť dôsledkom nedostatočného fungovania jedného z týchto dejov. Výsledky tiež nasvedčujú, že konečná fáza fytoextrakcie bola výrazne spomalená, čo mohlo byť spôsobené odumretím rastlinných koreňov a rastliny mohli uvoľniť sacharín späť do roztoku.

4.3 Fytoextrakčná schopnosť eliminácie umelých sladidiel jednotlivých druhov rastlín z roztokov

Dôležitým faktorom ovplyvňujúcim účinnosť a úspešnosť fytoextrakcie je výber vhodného rastlinného druhu, u ktorého bude účinnosť fytoextrakcie najvyššia. V nasledujúcej tabuľke sú uvedené hodnoty, ktoré zodpovedajú extrakčnej schopnosti použitých rastlinných druhov eliminovať vybrané umelé sladidlá a tieto hodnoty sú prepočítané na gram čerstvej váhy rastlín.

Tab. 4.3.1. Extrakčná schopnosť použitých rastlinných druhov na fytoextrakciu acesulfámu K a sacharínu. Množstvo vyextrahovanej látky vyjadrené v mg/g čerstvej váhy rastlín.

	Acesulfám K [mg/g čerstvej váhy]	Sacharín [mg/g čerstvej váhy]
Kukurica siata (<i>Zea mays</i> cv. 070062 A)	0,05	0,07
Kukurica siata (<i>Zea mays</i> cv. DKC2971 G1)	-	0,05
Slnečnica ročná (<i>Helianthus annuus</i> cv. Extrasol)	0,08	0,16
Slnečnica ročná (<i>Helianthus annuus</i> cv. Belem)	0,1	-
Repka olejná (<i>Bassica napus</i> cv. Cabeli)	0,04	-

5 Záver

Štúdium fytoextrakcie vybraných umelých sladidiel z vodných roztokov v „in vitro“ usporiadaní ukázala na relatívne malú schopnosť extrahovať sacharín a acesulfám K z vodných roztokov, účinnosť extrakčného procesu je pre obe látky a všetky rastlinné species 40 – 50 %. Z orientačných experimentov nemožno jednoznačne posúdiť, či sa jedná o adsorpciu na povrch koreňových tkanív, či absorpciu v koreňoch, prípadne spojenou s ďalšou translokáciou v rastline. Nízke množstvo extrahovaných substancií, ktoré boli z dôvodu ľahších analýz použité v mnohonásobne vyššej modelovej koncentrácii než sú reálne v ekosystéme, môžu súvisieť s ich toxicitou voči koreňovým tkanivám, prípadne môže súvisieť s vysokou polaritou zlúčenín, pre ktoré nie je v koreňoch vhodný a dostatočne výkonný transportný systém. Prakticky rovnaké výsledky pre obe látky nie sú nijak prekvapivé, pretože sa jedná o veľmi podobné chemické štruktúry. Zaujímavým výsledkom je však minimálny vplyv pridanej sacharózy do média. Túto rastlina využíva ako ďalší zdroj energie, pretože „in vitro“ kultivované rastliny nie sú plne autotrofné. Rastové podmienky sú teda výrazne lepšie a možno očakávať i väčší nárast biomasy a lepší metabolický stav, čo obvykle rezultuje vo vyššie percento fytoextrakcie. Nezávislosť na metabolickom stave svedčí o určitom podiele adsorbčných dejov v študovanom systéme, ktorý je však k časovému poklesu koncentrácie študovaných látok v médiu zjavne sprevádzaný ďalším aktívnym extrakčným dejom spôsobeným rastlinou. Nie je možné vylúčiť ani toxické vplyvy pridaných substancií obsahujúcich vo svojej štruktúre sulfonamidovú štruktúru, a tým ani čiastočné odumieranie vlasových koreňov spojené s uvoľňovaním ad- a absorpčných látok späť do média. Výsledný pokus je potom superpozíciou všetkých opísaných dejov. Celková schopnosť fytoextrakcie u testovaných kultivarov slnečnice a kukurice nie je príliš vysoká, avšak z technologického hľadiska predstavuje zaujímavú možnosť redukcie študovaného znečistenia.

Referencie

- [1] M. V. S. Pinheiro, M. N. Oliveira, A. L. B. Penna, A. Y. Tamime: The effect of different sweeteners in low – calorie yogurts – a review. *International Journal of DairyTechnology*, 58(4), 193 – 199 (2005).
- [2] Summaries of EU legislation: Authorised sweeteners. Dostupné z URL: <http://europa.eu/legislation_summaries/other/121069_en.htm> [cit. 20.4.2011].
- [3] M. Scheurer, H.-J. Brauch, F. T. Lange: Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394: 1585 – 1594 (2009).
- [4] Bc. Kristýna Fajkusová: Je to sladké a cukr to není. Co je to?, Bakalářská práce, MU Brno, s. 9, 13, 14, 25 (2010).
- [5] Karel Číž: Alternativní sladidla. *LISTY CUKROVARNICKÉ a ŘEPAŘSKÉ*, 124, č. 9 – 10, s. 278 – 279 (2008).
- [6] C. R. Wittehouse, J. Boullata, L. A. McCauley: The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *American Association of Occupation Health Nurses*, 56(6), 251 – 259 (2008).
- [7] International Programme of Chemical Safety, INCHEM: Neotame. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v52je08.htm>> [cit. 21.4.2011].
- [8] Výskumný ústav potravinársky, Informácie pre spotrebiteľov: Spotreba cukru a náhradných sladidiel. Dostupné z URL: <<http://www.vup.sk/index.php?start&id=16&mainID=4&navID=35>> [cit. 20.4.2011].
- [9] Lyn O'Brien Nabors: Alternative Sweeteners. *Marcel Dekker, Inc.*, New York 2011, p. 5 – 12, 13 – 30, 63 – 85, 147 – 164, ISBN: 0-8247-0437-1.
- [10] International Programme of Chemical Safety, INCHEM: Saccharin. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je25.htm>> [cit. 4.4.2011].
- [11] J. Horne, H. T. Lawless, W. Speirs, D. Sposato: Bitter Taste of Saccharin and Acesulfame-K. *Chemical Senses*, 27, 31 – 38 (2002).
- [12] M. Doležal: Sladidla používaná ve farmácii a potravinářství. *Praktické lékařství*, 5(1), 29 – 31 (2009).
- [13] B. Caballero, P. M. Finglas, L. Trugo: Encyclopedie of Food Sciences and Nutrition. *Academic Press*, New York 2003, p. 2, 1713, ISBN: 978-0-12-227055-0.

- [14] International Programme of Chemical Safety, INCHEM: Acesulfame Potassium. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v16je02.htm>> [cit. 2.4.2011].
- [15] M. R. Weihrauch, V. Diehl: Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk. *Annals of Oncology*, 15, 1460 – 1465 (2004).
- [16] International Programme of Chemical Safety, INCHEM: Sodium cyclamate. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44aje36.htm>> [cit. 17.4.2011].
- [17] I.J. Buerge, M. Keller, H.-R. Buser, M. D. Müller, T. Poiger: Saccharin and Other Artificial Sweeteners in Soils: Estimated Inputs from Agriculture and Households, Degradation, and Leaching to Groundwater. *Environmental Science & Technology*, 45, 615 – 621 (2011).
- [18] I. J. Buerge, H.-R. Buser, M. Kahel, M. D. Müller, T. Poiger: Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environmental Science & Technology*, 43, 4381 – 4385 (2009).
- [19] D. R. Van Stempvoort, J. W. Roy, S. J. Brown, G. Bickerton: Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *Journal of Hydrology*, 401, 126 – 133 (2011).
- [20] C. Bosetti, S. Gallus, R. Talamini, M. Montella, S. Franceschi, E. Negri, C. La Vecchia: Artificial Sweeteners and the Risk of Gastric, Pancreatic, and Endometrial Cancers in Italy. *Cancer Epidemiology & Biomarkers Prevention*, 18(8), 2235 - 2238 (2009).
- [21] M. M. Andreatta, A. Navarro, A. R. Eynard: Urinary Tract Tumors, Biology and Risk for Artificial Sweeteners Use with Emphasis on some South American Countries. *Current Nutrition & Food Science*, 4, 185 – 195 (2008).
- [22] É. Polyák, K. Gombos, B. Hajnal, K. Bonyár-Müller, Sz. Szabó, A. Gubicskó-Kisbenedek, K. Marton, I. Ember: Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. *Acta Physiologica Hungrica*, 97(4), 401 – 407 (2010).
- [23] C. Martínez, E. González, R. S. García, G. Salas, F. Constantino-Casas, L. Macías, I. Gracia, C. Tovar, C. Durán-de-Bazúa: Effects on Body Mass of Laboratory Rats after Ingestion of Drinking Water with Sucrose, Fructose, Aspartame, and Sucralose Additives. *The Open Obesity Journal*, 2, 116 – 124 (2010).

- [24] R. J. Brown, M. A. De Banate, K. I. Rother: Artificial Sweeteners: A systematic review of metabolic effects in youth. *International Journal of Pediatric Obesity*, 5(4), 305 – 312 (2010).
- [25] S. Phelan, W. Lang, D. Jordan, R. R. Wing: Use of artificial sweeteners and fat – modified foods in weight loss maintainers and always – normal weight individuals. *International Journal of Obesity*, 33, 1183 – 1190 (2009).
- [26] R. J. Brown, M. Walter, K. I. Rother: Ingestion of Diet Soda Before a Glucose Load Augments Glucagon – Like Peptide – 1 Secretion. *Diabetes Care*, 32(12), 2184 – 2186 (2009).
- [27] J. Ma, M. Bellon, J. M. Wishart, R. Young, L. Ashley Blackshaw, K. L. Jones, M. Horowitz, Ch. K. Rayner: Effect of artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release on healthy subjects. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296, G735 – G739 (2009).
- [28] P. Humphries, E. Pretorius, H. Naudé: Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 451 – 462 (2008).
- [29] J. Barua, A. Bal: Emerging Facts About Aspartame, *Journal Of The Diabetic Association of India*, 35(4) (1995).
- [30] N. Jafari Ghavzan, R. K. Trivedy: Environmental pollution control by using phytoremediation technology. *Pollution Research*, 24(4), 875 – 884 (2005).
- [31] P. Soudek, Š. Petrová, D. Benešová, J. Kotyza, T. Vaněk: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické Listy*, 102, 346 – 352 (2008).
- [32] United States Environmental Protection Agency: Phytoremediation Resource Guide. Dostupné z URL: <<http://www.cluin.org/download/remed/phytoresgude.pdf>> [cit. 13.4.2011].
- [33] K. Dercová, J. Makovníková, G. Barančíková, J. Žuffa: Bioremediácia toxických kovov kontaminujúcich vody a pôdy. *Chemické listy*, 99, 682 – 693 (2005).
- [34] T. Murashige, F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497 (1962).