

**České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská**

**Czech Technical University
Faculty of Nuclear Science and Physical Engineering**

**Fytoremediace – metoda dekontaminace půd a vod znečištěných
organickými látkami, kovy a radionuklidy**

**Phytoremediation – A Method of Soil and Water Decontamination
from Organic Pollutants, Metals, and Radionuclides**

Ing. Stanislav SMRČEK, CSc.

SUMMARY

The contribution deals with the basic aspects of phytoremediation technology and its theoretical study by using *in vitro* models. In the first part of the lecture are defined the principles of phytoremediation and special processes as phytoextraction, biotransformations, and xenobiotics storage are discussed. In the second part our own results with radionuclides phytoextraction are presented. It was shown, that ^{90}Sr , ^{137}Cs , and ^{133}Ba were effectively extracted from aqueous media by using *in vitro* cultivated whole plant species such as *Helianthus annuus*, *Zea mays*, *Sinapis alba*, *Brassica napus*, and *Pisum sativum*. The extracted ions were translocated from roots to shoots in amounts which are sufficient for practical application of phytoremediation. In the last part of the contribution phytoextraction, metabolism and storage of chlorinated aromatic xenobiotics pentachlorophenol are in the centre of interest. In the *in vitro* phytoextraction experiments it was established, that pentachlorophenol is efficiently extracted from the cultivation media by plant species e.g. *Pisum sativum*, *Zea mays*, or *Medicago sativa*. The study of pentachlorophenol biotransformation and plant storage was carried out using ^{14}C labelled pentachlorophenol, which was prepared by original synthetic procedure. The experiments with labelled pentachlorophenol demonstrated, that the compound investigated or its metabolites are translocated to shoots and are stored in the lignin component of the cell walls.

SOUHRN

Přednáška se zabývá základními aspekty fytořediační technologie a jejím teoretickým studiem. První část definuje vlastní fytořediaci a diskutuje základní procesy jako fytoextrakce, biotransformace a ukládání xenobiotik v rostlinných tkáních. Ve druhé části jsou prezentovány vlastní výsledky v oblasti fytoextrakce radionuklidů. V experimentech s ^{90}Sr , ^{137}Cs , a ^{133}Ba bylo prokázáno, že *in vitro* kultivované rostlinné species jako *Helianthus annuus*, *Zea mays*, *Sinapis alba*, *Brassica napus* a *Pisum sativum* jsou schopny efektivně extrahovat uvedené radionuklidy a transportovat je do nadzemních částí. Třetí část přednášky se zabývá fytoextrakcí a metabolismem chlorovaného xenobiotika pentachlorfenolu. Fytoextrakční experimenty prokázaly účinnou extrakci pentachlorfenolu v *in vitro* kulturách rostlin jako *Pisum sativum*, *Zea mays* či *Medicago sativa*. Studium vlastní transformace a ukládání pentachlorfenolu bylo provedeno pomocí ^{14}C značeného pentachlorfenolu, který byl připraven originální radiochemickou syntézou a prokázal, že zkoumaná látka či její metabolity jsou transportovány do nadzemních částí rostlin a ukládány do ligninových struktur buněčné stěny.

Klíčová slova: fytořemediace, rostlinný metabolismus, biotransformace, radionuklidy, pentachlorfenol, ukládání xenobiotik

Keywords: phytoremediation, plant metabolism, biotransformation, radionuclides, pentachlorophenol, xenobiotics storage

Obsah:

1. Úvod	6
2. Fytoremediace	6
3. Principy fytoremediační technologie	8
4. Studium fytoremediace (vlastní výsledky)	10
4.1. Fytoextrakce radionuklidů	10
4.2. Fytoextrakce, biotransformace a distribuce pentachlorofenolu	14
5. Literatura	19
6. Ing. Stanislav Smrček, CSc.	20

1. Úvod

Rozvoj vědy a techniky přispěl zásadně ke zlepšení životní úrovně lidské populace, rovněž však přinesl řadu negativních jevů mezi které nepochybně patří i kontaminace ekosystému produkty či odpadními látkami chemického, elektrotechnického a strojírenského průmyslu nebo odpadními produkty energetiky. Častá je i kontaminace půd a vod produkty spotřební chemie, které v minulých dobách často nebyly testovány z hlediska jejich osudu v biosféře. Navíc je v tomto případě závažný fakt, že tyto látky mohou být v biosféře transformovány na metabolity podstatně nebezpečnější než byl primární polutant a v této formě atakovat potravní řetězce vyšších živočichů a tím i člověka.

Poznání nebezpečí plynoucího z přítomnosti jak cizorodých organických sloučenin, tak i nepřírodných koncentrací např. těžkých kovů, vedlo k bezprostřední snaze najít technologické postupy, které by vedly dekontaminaci. Byla tak vyvinuta řada *in situ* i *ex situ* technologií, více či méně finančně a ekonomicky náročných, vedoucích k částečné či úplné dekontaminaci. Je ovšem rovněž nutné konstatovat, že řada těchto technologických postupů představuje hrubý zásah do krajiny se všemi z toho plynoucími důsledky. Na druhé straně byly vyvinuty či se testují technologie výrazně příznivější, ba i dokonce zlepšující vzhled krajiny. V současné době nejprogresivněji rozvíjejícím se procesem tohoto typu je fytoremediace.

2. Fytoremediace

Fytoremediace je definována jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci nebo odstraňování kontaminantů z životního prostředí [1]. Fytoremediační technologie využívá všech biologických, chemických a fyzikálních procesů, které mají souvislost s růstem a výživou vyšších rostlin. Pro úspěch této technologie je nutná biologická dostupnost kontaminantů, která je dána především lipofilitou látky, typem půdy a stářím kontaminace [2]. Fytoremediace má největší uplatnění na místech s povrchovým znečištěním a je velmi účinná především pro hydrofobní polutanty, jako například aromatické uhlovodíky, chlorovaná rozpouštědla nebo nitrosloučeniny. Účinná je rovněž pro ionty kovů a radionuklidů .

Fytoremediační technologie se postupně stává jedním z procesů, který výrazně přispívá k odstranění xenobiotik z životního prostředí. Navíc podobné procesy probíhají v přírodě zcela přirozeně a vzhledem k obrovskému množství rostlinné biomasy není tento přirozený příspěvek k dekontaminaci rozhodně zanedbatelný. O to víc je potřebné zabývat se vlastním mechanismem interakce rostlin s xenobiotiky, neboť často lze, zvláště v případě organických polutantů, předpokládat metabolickou aktivaci polutantů primárních.

Hodnotíme-li fytoremediační proces nelze ale opomenout i určité nevýhody, které tato technologie v sobě skrývá. Především se jedná o dlouhodobý dekontaminační proces, který nelze uskutečnit v průběhu jednoho vegetačního období. Dekontaminace, která je obvykle úměrná množství vyprodukované biomasy, je potom závislá na povaze půdy, obsahu dostupných

živin, klimatických podmínkách ale zároveň i na charakteru polutantu a jeho toxicitě vůči použité rostlinné species. Výhodou jsou však velmi nízké náklady. Při předběžných kalkulacích bylo vypočteno, že náklady na remediaci pomocí rostlin lze snížit až na 0,05 EUR/m³[1].

Při zkoumání účinnosti fytoremediace byla zjištěna druhová závislost. Velmi výhodné z hlediska účinnosti se pro organické polutanty ukazují stromy z rodu *Salicaceae* (topoly a vrby), z nichž především hybridní topoly jsou velmi odolné a rychle rostou. Klasickým příkladem reálné aplikace je použití hybridních topolů (*Populus deltoides nigra*, cv. Imperial Carolina) v Iowě s cílem vytvoření nárazníkové zóny pro dusičnany a atrazinové herbicidy. Po aplikaci rostlin koncentrace dusičnanů ve spodní vodě klesla z 50–100 mg/l na méně než 5 mg/l a celkové množství atrazinu v půdě bylo sníženo o 10–20 % [3]. Podobně byly topoly použity pro odstraňování chlorovaných alifatických uhlovodíků, 2,4,6-trinitrotoluenu a aromatických uhlovodíků z půdy [4]. Použití hybridních topolů má však i svoji stinnou stránku. Jedná se o rostlinu poměrně agresivní, která se rychle rozšiřuje a výrazně mění charakter krajiny. Z tohoto hlediska jsou pro fytoremediaci výhodnější menší rostliny, s výhodou pak kulturní rostliny, u kterých je zvládnuta agrotechnika a dají se na konci vegetačního období sklídit a odpovídajícím způsobem zpracovat. Z tohoto hlediska lze využívat rostliny jako např. kukuřice, řepka, hořčice, vojtěška či různé kultivary trav. Byly testovány i další kulturní rostliny. Třeba cukinky či dýně (*Cucurbita pepo* L. convar. Giromontiina cv. Diamant F1, *C. pepo* L. cv. Gelber Zentner) prokázaly vysokou schopnost akumulace dibenzofuranů. V případě použití rostlin okurky seté byla dokonce prokázána vysoká akumulace uvedeného xenobiotika ze vzduchu [5].

Z hlediska odstraňování iontů těžkých kovů či radionuklidů je situace obdobná. Rostliny v určité druhové závislosti jsou schopny absorbovat kovové ionty a ukládat je ve svých tkáních. Zvláštní pozornost je v tomto ohledu věnována takzvaným hyperakumulátorům, což jsou takové rostlinné druhy, které mají mimořádnou schopnost akumulovat kovy a to až v koncentracích 1 – 10 mg/g sušiny. V této souvislosti je však třeba si uvědomit, že tyto species většinou vykazují zvýšenou selektivitu pro určitý kovový iont, navíc to jsou v převážné většině rostliny s malým vzrůstem (řada z nich patří do skupiny sukulentů) a mnohdy nevhodné jak z hlediska agrotechnického, tak i z hlediska potřebných klimatických podmínek. Z uvedeného vyplývá, že mnohem výhodnější se jeví druhá možnost, použít rostliny s vysokým nárůstem biomasy, i když výsledná koncentrace v rostlině na konci vegetačního období je poměrně nízká.

Zvláštní pozornost si zasluhují studie sledující schopnost vyšších rostlin extrahovat a akumulovat ionty radionuklidů. V tomto ohledu je fytoremediacní technologie zvláště výhodná, protože zdaleka nelze předpokládat dosažení toxických koncentrací iontů v případě radioaktivního spadu. V tomto smyslu byla publikováno několik podnětných prací, které se zabývají akumulací iontů kobaltu, stroncia či cesia ve vybraných rostlinných druzích [6,7]. Výsledky jsou

závislé nejen na druhu rostliny a radionuklidu, velký vliv hraje i typ půdy, minerální zásobením rostlin, obsah organické složky v půdě, obsah solí apod. Typickou studií fytořemediace je potom práce Entryho a Watruda [8] zabývající se extrakcí ^{137}Cs a ^{90}Sr z uměle kontaminovaného pískového substrátu. Výsledky byly více než slibné, v jednom vegetačním období bylo rostlinami *Panicum virginatum* extrahováno přibližně 40% na začátku vnesené aktivity pro oba studované kontaminanty.

3. Principy fytořemediační technologie

Z hlediska mechanismu lze fytořemediační procesy rozdělit na několik dějů:

- fytoextrakce
- fytotransformace
- rhizofiltrace
- fytostabilizace

Fytoextrakce je základním procesem, který sleduje přechod xenobiotika do kořenového systému, případně následnou translokaci rostlinným organismem. Je podstatná a využitelná jak pro organické sloučeniny, tak pro kovové ionty.

Fytotransformace je metabolický proces, který za pomoci enzymových systémů přetváří původní extrahované molekuly organických polutantů na molekuly odpovídajících metabolitů. Enzymy zúčastněné v tomto pochodu jsou především rostlinné peroxidasy, v určité míře jsou metabolity i výsledkem působení oxygenas souvisejících s rostlinným cytochromem P450. Metabolické přeměny či modifikace skeletu se samozřejmě týkají výhradně organických molekul. V této souvislosti je vhodné připomenout analogii mezi metabolismem xenobiotik u živočichů a rostlin. U živočichů je tato manipulace třífázová. V první fázi dochází k zavedení či odmaskování polárních funkčních skupin, což vede ke zvýšení hydrofility molekuly. Druhá fáze biotransformace, nazývaná též konjugační, spojuje buďto původní, častěji však již transformované molekuly s polárními nosiči, což dále zvýší polaritu molekuly v níž je obsažen základní skelet xenobiotika. V této formě, která je snadno prostupná vylučovacím systémem, je také konjugát, či metabolit vyloučen. Podobné procesy probíhají i v rostlinných organismech s tím rozdílem, že vylučovací fáze je nahrazena ukládáním v rostlinných tkáních, rostlina totiž nemá efektivní vylučovací systém, který by ji umožnil zbavit se cizorodé substance či jejího metabolitu (konjugátu). Ukládání těchto transformovaných či konjugovaných látek probíhá poměrně složitým a v současné době ještě ne úplně vyřešeným mechanismem. Úložným místem pro některé konjugáty jsou vakuoly [9]. Značná pozornost byla v této souvislosti věnována mechanismu transportu metabolitů přes membránu vakuol. Často se v tomto případě hovoří o tzv. vakuolární pumpě, která je specifická pro glutathionové konjugáty [10]. Mechanismus vlastního přenosu je nejčastěji prezentován dvěma modely a to model pumpy, který představuje tvorbu póru, kterým mohou procházet hydrofilní substráty, nebo model flip-flop,

při kterém se substrát váže na vnější část membrány a překlopením se dostává do vakuoly [11]. Metabolity, které nemohou být uloženy tímto postupem, podléhají tzv. sekundární konjugaci, která představuje reakce s některými složkami buněčné stěny, jako jsou ligniny, pektiny, nebo hemicelulosa. Tímto mechanismem se ukotví k buněčné stěně a celý proces lze chápat jako imobilizaci metabolitu, který potom nemůže výrazně narušovat základní metabolické funkce rostliny.

V souvislosti s ukládáním metabolitů organických sloučenin je vhodné se zmínit rovněž o osudu kořenovým systémem rostlin sorbovaných a v rostlině transportovaných iontů kovů. Nelze tady samozřejmě hovořit o nějaké transformaci, nejnovější výzkumy však dokazují, že ionty jsou v rostlině kompleťovány, a v této formě rovněž ukládány do vakuol, či dochází k imobilizaci komplexů na buněčných stěnách. Nejčastějšími komplexačními činidly v rostlinách jsou kromě organických kyselin [12] takzvané fytochelatiny [13], které lze charakterizovat jako cysteinem bohaté peptidy a rovněž metalothioneiny, což jsou opět cysteinem bohaté proteiny s vysokou afinitou kationtům kovů [14].

Fytostabilizace je definována jako proces, který má za úkol zastavit šíření kontaminantu do širšího okolí. Bariéra kořenů rostlin může v určitých případech omezit migraci polutantů v půdě ať už mechanismem kořenové adsorpce či absorpce nebo tvorbou nerozpustných forem v důsledku interakce kontaminantu s kořenovými exsudáty. Podobný proces, který se týká dekontaminace znečištěných vod se nazývá rhizofiltrace. Oba tyto procesy se spíše využívají při manipulaci s kovovými ionty resp. radionuklidy, jsou však použitelné i v případech znečištění organickými sloučeninami [15].

V diskutované souvislosti je rovněž nutné se alespoň zmínit o dalším faktoru těsně souvisejícím s účinností fytoředičních procesů. Oblast kořenů, která se nazývá rhizosféra a kde probíhá primární proces absorpce kontaminantů nelze omezit pouze na popis interakcí mezi půdní matricí, půdním roztokem a vlastními kořeny. Je nutné zahrnout rovněž fakt, že rostlina produkuje nezanedbatelné množství organických exsudátů, které výrazně podporují růst půdních mikroorganismů. Ve svém důsledku tento fakt výrazně ovlivňuje jak speciální v případě anorganických iontů, tak může způsobovat řadu mikrobiálních biotransformací v případě přítomnosti organických polutantů [16].

Závěrem obecné části je rovněž vhodné připomenout i další důsledky teoretického studia fytoředičce. Výzkum účinnosti fytoextrakce a akumulace dovoluje nalézt vztahy mezi množstvím v rostlině kumulovaného xenobiotika a jeho koncentrací v okolním prostředí. U vhodných species tak je možné na základě stanovení koncentrace polutantů či jeho významného metabolitu vyhodnotit celkovou expozici sledovaným kontaminantem. Tento postup je nazýván biomonitorováním a byl například prakticky použit ve Finsku pro stanovení dlouhodobé zátěže trichloroctovou kyselinou [5]. Použitou rostlinou

byla borovice, která se k monitorování řady látek používá prakticky v celé západní Evropě.

Nelze pominout ani fakt, že testování široké škály rostlinných druhů vede na jedné straně k nalezení rostlinných species či jejich kultivarů s vysokou absorpční či akumulací schopností, na druhé straně však odhaluje druhy či kultivary, které mají schopnost akumulace xenobiotik minimální a jsou tak vhodné pro zemědělskou produkci na nepříliš kontaminovaných půdách.

Jakkoli se může zdát, že praktické využití fyto-remediační technologie je ještě v začátcích, je nutné konstatovat, že diskutovaná technologie je progresivně se rozvíjející metodou, která již našla i komerční využití, a jakkoli se zdá vzdálená běžnému životu tak je v této souvislosti vhodné uvést práci profesorky Pesetové [17], která sledovala fytoabsorpci oxidu uhelnatého, oxidů dusíku, formaldehydu, benzenu a chlorovaných rozpouštědel běžně pěstovanými pokojovými rostlinami. Získané výsledky byly více než překvapivé. V simulovaném kontaminovaném prostředí, které obsahovalo 120 ppm oxidu uhelnatého nebo 50 ppm oxidů dusíku bylo po 24 hodinách kontaktu s *Chlorophytum sp.* (zelenec) odstraněno 96 % CO a 99 % původního množství oxidů dusíku, v případě *Epipremnum sp.* (potos) 75 % původně vneseného CO. Pro organické sloučeniny se ukázaly nejučinnější druhy *Philodendron scandens*, *Chlorophytum elatum*, *Aglaonema sp.*, *Sansiviera trifasciata*, *Dracaena fragrans* a *Spatiphyllum clevelandii*, tedy pokojové rostliny běžné i v českých interiérech.

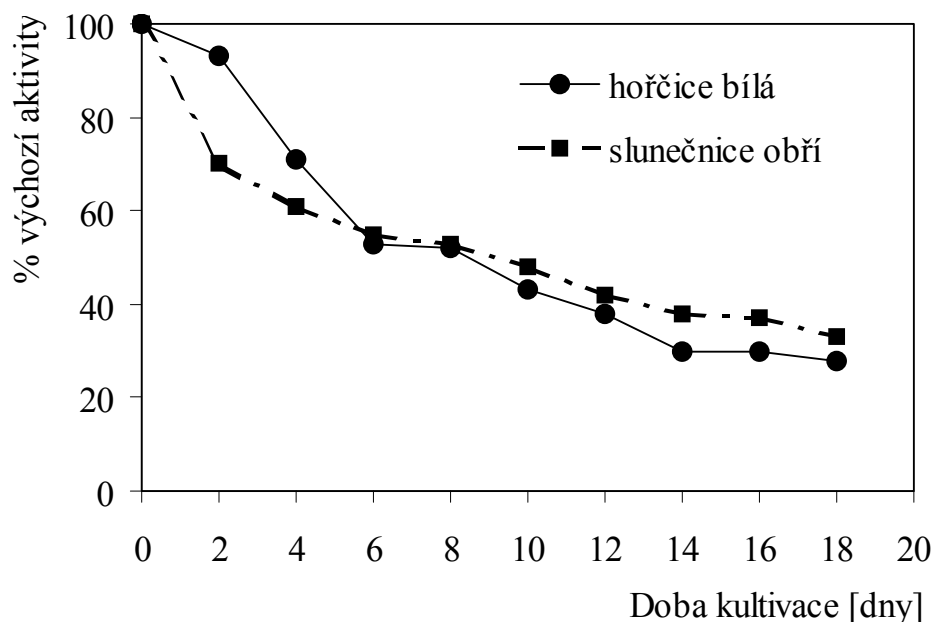
4. Studium fyto-remediace (vlastní výsledky)

4.1. Fytoextrakce radionuklidů

Studium fyto-remediace se běžně provádí na různých úrovních od modelových systémů v *in vitro* uspořádání přes skleníkové studie až po praktické polní simulace či reálné testování. V naší laboratoři se zabýváme právě teoretickými aspekty fyto-remediace, především studiem fytoextrakce a transportu xenobiotik či iontů. Experimenty jsou prováděny převážně v *in vitro* uspořádání. Kultivace *in vitro* a s ní spojené experimenty mají několik výhod. Především růst rostlin je nezávislý na ročním období a klimatických podmínkách vegetační sezóny, rostliny jsou naprosto sterilní, odpadá tedy interakce rostlinného organismu se všemi druhy patogenů či škůdců, nezanedbatelnou výhodou je i rychlejší růst rostlin ve srovnání s polními podmínkami. Toto uspořádání tedy umožňuje sledovat vzájemnou interakci, v tomto případě anorganických iontů s rostlinou, bez dalších rušivých vlivů, navíc je možné vhodnými změnami kultivačního media simulovat různé minerální složení půd a tím i půdních roztoků, případně testovat vliv metabolických aktivátorů či chelatačních činidel, které se při fytoextrakci kovů z půd či vod občas používají. Na druhé straně je nutno přiznat, že *in vitro* experiment je mnohem méně komplexní, neboť zdaleka nepostihuje všechny

faktory reálné kultivace v přírodě, ukazuje se však že je velmi vhodným a cenným podkladem pro další semireálné a reálné experimenty.

Studium fytoextrakce v podstatě zahrnuje kultivaci sterilních rostlin na vhodně vybraném mediu s následnou kontaminací radionuklidem. V tomto případě není nutná primární fáze testování toxicity, neboť koncentrace těchto kontaminantů lze v reálném uspořádání považovat za velmi nízké, tudíž předpoklad fytotoxicity není reálný. V jedné z provedených studií jsme testovali schopnost rostlin extrahovat ze živného media ^{137}Cs , ^{90}Sr a ^{133}Ba . Kultivační médium dle Murashiga a Skooga [18] bylo kontaminováno za sterilních podmínek roztokem jednotlivých radionuklidů a postupně byly odebrány vzorky media a vyhodnocen úbytek aktivity. Tyto experimenty byly provedeny na řadě rostlinných species, vesměs vybraných z běžně kultivovaných rostlin se snadným zdrojem semen a dobře zvládnutou agrotechnikou (např. kukuřice-různé kultivary, řepka ozimá, hořčice bílá, slunečnice obří nebo peluška jarní). Příklady získaných fytoextrakčních křivek jsou uvedeny na obrázku 1.



Obr. 1 Časová závislost úbytku ^{90}Sr v kultivačním mediu pro *in vitro* kultivované rostliny: slunečnice obří a hořčice bílá. Hodnoty aktivity na ose y jsou vyjádřeny v % výchozí aktivity. Kultivace tří rostlin v jedné baňce. Výchozí hodnota aktivity je stanovena 1 minutu po přidání sterilního roztoku radioizotopu do kultivačního media. Měření radioaktivity bylo provedeno metodou kapalinové scintilace. Vynesené hodnoty jsou průměrem 3 – 6 experimentů. Hodnoty získané kultivací media bez přítomnosti rostlin jsou odečteny.

Z grafu je zřejmé, že během kultivace nastává významný úbytek aktivity v kultivačním mediu. Snad ještě podstatnější je však fakt, že tendence

extrahovat radioaktivní substanci přetrvává během celého kultivačního cyklu. Znamená to především to, že během kultivace dochází k průběžné extrakci, byť její rychlost se ve většině případů s časem poněkud snižuje. Pokud celý proces hodnotíme z tohoto hlediska, není třeba diskutovat fakt poněkud dramatictějšího úbytku aktivity během prvních dvou dnů kultivace, který je zcela běžný a někteří autoři jej vysvětlují sorpcí, někteří elicitací rostlinného metabolismu. Ať už je tento děj způsoben jakýmkoliv procesem, nepodařilo se nám prokázat významnější množství extrahovatelné aktivity při pokusech uvolnit předpokládané povrchově sorbované ionty sonikací či extrakcí v přítomnosti chelatačních činidel.

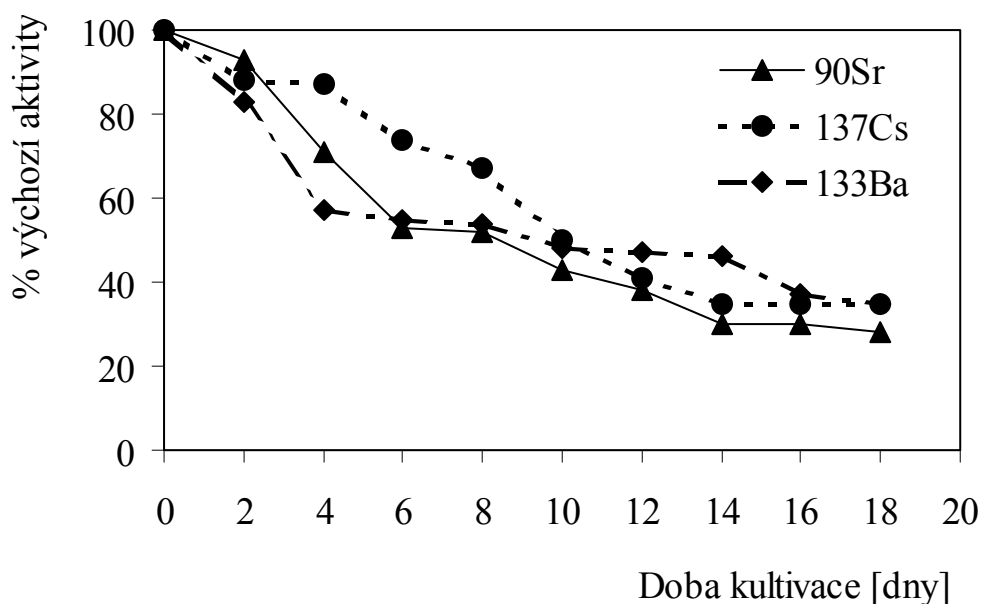
Z výsledků rovněž vyplývá druhová závislost účinnosti extrakce a v této souvislosti je nutné poznamenat, že získané výsledky nesledují rozdíly v odlišném nárůstu biomasy pro jednotlivá species a tudíž naměřené rozdíly jsou důsledkem rozdílné schopnosti rostlinných druhů extrahovat ionty testovaného kovu.

Zajímavé je rovněž porovnání účinnosti fytoextrakce pro různé radionuklidy. V tabulce 1 jsou uvedeny zaokrouhlené průměrné hodnoty fytoextrační účinnosti vypočtené jako % úbytku výchozí aktivity pro tři radionuklidy a nejčastěji námi testované rostlinné druhy.

Rostlina	⁹⁰Sr	¹³⁷Cs	¹³³Ba
<i>Pelushka jarní</i>	60	10	40
<i>Slunečnice obří</i>	65	30	55
<i>Kukuřice setá</i>	60	30	60
<i>Hořčice bílá</i>	80	70	70
<i>Řepka ozimá</i>	50	40	70

Tab.1 Průměrné hodnoty úbytku radioaktivity ve fytoextrakčních experimentech pro testované radionuklidy a sadu rostlinných species (vyjádřeno jako % úbytku výchozí aktivity).

Srovnání fytoextrakčních křivek dále umožňuje analýzu nejen celkové účinnosti v jednom kultivačním cyklu, ale i posouzení rychlosti potenciální dekontaminace vzhledem k různým radionuklidům. Na obrázku 2 je uvedeno takové srovnání pro rostliny hořčice bílé.



Obr. 2 Srovnání fytoextrakčních křivek pro rostliny hořčice bílé a ⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs a ¹³³Ba (y osa jako procenta výchozí aktivity).

Samotné studium fytoextrakce je sice zásadní, nicméně nepostihuje faktor transportu do nadzemních částí rostliny, který je z hlediska fyto-remediace podstatný neboť se předpokládá transport do nadzemních částí rostlin, které by následně bylo možné sklídit a vhodně zpracovat. Za účelem studia distribuce radionuklidů v rostlině byla v naší laboratoři provedena řada experimentů, které měly zjistit do jaké míry probíhá transport extrahovaných radionuklidů v kultivovaných species. Výsledky pro ⁹⁰Sr jsou uvedeny v tabulce 2 jako distribuce mezi kořenovou, stonkovou a listovou tkání. Přepočet na jednotkovou hmotnost rostlinné tkáně potom umožňuje snadno porovnat extrakční účinnost jednotlivých rostlinných species.

Tkáň vs. %A ₀ /g rostliny	peluška	slunečnice	kukuřice	hořčice	řepka
List	15	35	13	17	20
Stonek	15	27	13	13	24
Kořen	32	32	27	26	31

Tab. 2 Distribuce ⁹⁰Sr v jednotlivých částech rostlin. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech výchozí aktivity a vztaženy k 1 g rostlinné tkáně..

Z tabulky 2 vyplývá i další zásadní poznatek, že ⁹⁰Sr je nejen extrahováno kořenovým systémem, ale je následně transportováno do nadzemních částí rostliny. Z hlediska ⁹⁰Sr se jeví jako nejvýhodnější rostlinný organismus slunečnice či řepka, ¹³⁷Cs se v nadzemní části koncentruje nejvýrazněji u hořčice a řepky (až trojnásobné množství v nadzemní části vzhledem ke kořenové, při celkové extrakci kolem 60 % výchozí aktivity), u ¹³³Ba je poměr mezi

kořenovou a nadzemní částí 1:2 prakticky uniformně u všech testovaných rostlin.

Na základě poměrně slibných výsledků byly provedeny modelové pokusy fytoextrakce z uměle kontaminovaného substrátu. Komerční zahradnický substrát s definovaným množstvím minerálních živin a rašeliny byl kontaminován roztoky ^{90}Sr , ^{137}Cs a ^{133}Ba o známé aktivitě a do substrátu byly vysazena semena pelušky jarní, slunečnice obří, hořčice bílé a řepky ozimé. Kultivace byla provedena za umělého osvětlení v termostatovaném boxu. Vzhledem k tomu, že použité kultivační uspořádání nedovoluje dlouhodobé kultivace a rovněž z důvodů srovnání výsledků jsme zvolili přibližně stejnou dobu kultivace pro interakci s kontaminovaným substrátem, jako tomu bylo v experimentech na kapalných mediích. Procentuální účinnost fytoextrakce se ukázala nižší, což vyplývá z prostého faktu, že možnost fytoextrakce je pouze z půdního roztoku, sorpční kapacita půdy je vysoká a celkové množství iontů a tím i radioaktivity je rozděleno mezi pevnou a kapalnou fází půdy. Přesto však účinnost pro ^{90}Sr 10 – 20 % vzhledem k celým rostlinám a 5 – 10 % vzhledem k nadzemním částem během přibližně třítydenní kultivace je velmi uspokojivá. V souhlase s experimenty na kapalných mediích byla účinnost fytoextrakce u ^{137}Cs podstatně nižší než u ^{90}Sr . Výrazné rozdíly byly nalezeny u ^{133}Ba , což pravděpodobně souvisí s možností pevnější sorpce na půdní částice či tvorbou nerozpustných forem. Trend druhové závislosti a distribuce versus příslušná species byly nalezeny ve shodě s modelovými experimenty na kapalných mediích, což dokumentuje oprávněnost a možnost zkoumání procesů spojených s fyto-remediačními technologiemi ve zvolených na použitých *in vitro* podmínkách. Závěrem je možné konstatovat, že na základě uvedených i dalších získaných výsledků, je možné považovat za reálnou fytoextrakci zkoumaných radionuklidů, samozřejmě se zřetelem k aktuálním podmínkám.

4.2. Fytoextrakce, biotransformace a distribuce pentachlorfenolu. (vlastní výsledky)

Těžiště práce v posledním období spočívá ve výzkumu *in vitro* modelů fyto-remediačního procesu s cílem stanovit účinnost fytoextrakce, vliv na základní enzymové systémy, způsob enzymatického zpracování a pravděpodobná místa ukládání pentachlorfenolu.

Pentachlorfenol je sloučenina, která našla široké uplatnění v běžném životě převážně ve formě fungicidu či herbicidu. Obrovská množství PCP byla použita k impregnaci dřeva proti dřevokazným houbám a škůdcům. Postupem času se však ukázalo, že je nebezpečná i pro vyšší organismy, chronická otrava se projevuje poškozením jater, plic, ledvin a centrálního nervového systému. Prokázáno bylo rovněž ukládání v tukové tkáni. V Kanadě a ve Švédsku byly nalezeny nezanedbatelné koncentrace PCP v tukových tkáních hospodářských zvířat. Všechna tato fakta vedla k zákazu komerčního používání PCP a sloučenina byla zařazena na seznam nejvýznamnějších polutantů u

Environmental Protection Agency. Z těchto důvodů je pochopitelná extrémní snaha zmapovat chování PCP v živých organismech. Zatímco osud PCP v živočišných organismech a mikroorganismech je známý, interakce PCP s rostlinami je známa pouze z hlediska jeho herbicidního působení. Rovněž je potřeba si uvědomit, že PCP je značně perzistentní polutant, který se navíc stále objevuje v životním prostředí v důsledku bělení chlorem či chlorování vody, postupně se uvolňuje z impregnovaných dřevěných konstrukcí a ani při spalování PCP ošetřeného dřeva nedochází k úplnému spálení a určitá část se uvolňuje a přechází do ekosystému se spalinami.

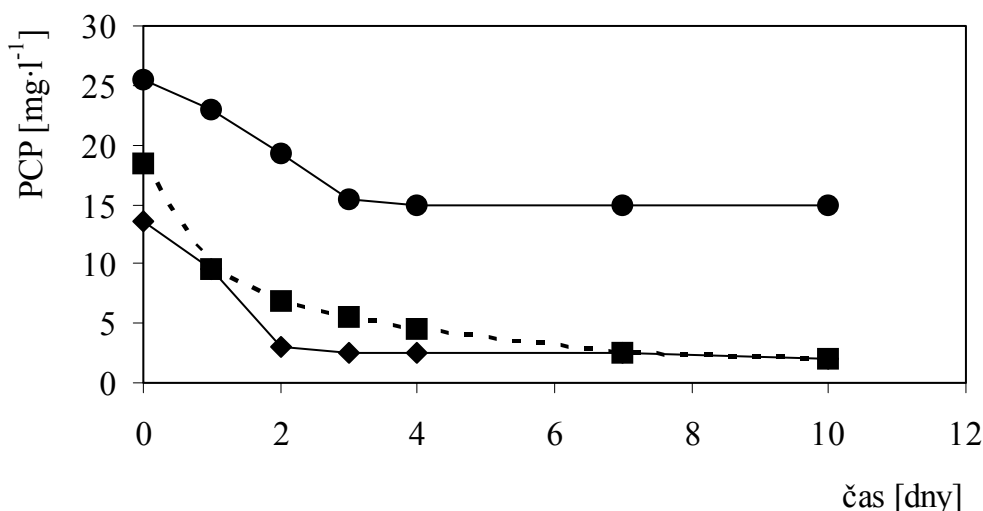
Z hlediska strategie výzkumu je v případě organických polutantů nutný poněkud jiný přístup než při zkoumání radionuklidů. Především má většina organických sloučenin vliv na růst rostlin, mnohdy přímo herbicidní účinnost. Stanovení schopnosti růstu v přítomnosti xenobiotika je potom základním experimentem. Následujícím krokem je potom studie fytoextrakční účinnosti s následnou analýzou rostlin kultivovaných na mediu obohaceném o zkoumané xenobiotikum z hlediska obsahu xenobiotika a přítomnosti jeho metabolitů. Z hlediska obsahu metabolitů je rovněž nutné zkoumat i kultivační medium, neboť některé konjugáty mohou být vylučovány zpětně do media. Z hlediska fytoremediace je to vážná skutečnost, která by mohla výrazně zhoršovat účinnost procesu. V některých případech je navíc účelné zkoumat biotransformace odděleně za použití tkáňových či orgánových kultur. Výhodné jsou především suspenzní buněčné kultury, které rostou velmi rychle, mají velký styčný povrch s roztokem xenobiotika a bývají metabolicky velmi aktivní. Nevýhodou je, že řada biotransformačních reakcí probíhá až v diferencovaných buňkách vyvinuté rostliny a v nediferencované formě mohou být některé metabolické dráhy neúplné. Má to však i kladný dopad, protože v kultuře nediferencovaných buněk mohou být nalezeny metabolity, které v celé rostlině podléhají velmi rychlé následné přeměně.

Vlastní výzkum začal výběrem potenciálně vhodných rostlinných species a stanovením jejich schopnosti růstu v přítomnosti různých koncentrací PCP. Výsledky pro některé testované rostliny jsou uvedeny v tabulce 3.

Rostlina	Maximální použitelná koncentrace PCP pro <i>in vitro</i> kultivaci (mg/l)
<i>Brassica napus</i> (řepka)	10
<i>heliantu annuus</i> (slunečnice)	20
<i>Medicago sativa</i> (vojtěška)	5
<i>Phacelia tanacetifolia</i> (svazenka)	2
<i>Sinapis alba</i> (hořčice)	10
<i>Triforium repens</i> (jetel)	10
<i>Trifolim incarnatum</i> (jetel)	5
<i>Zea mays</i> (kukuřice)	40

Tab. 3 Maximální možné koncentrace PCP pro *in vitro* kultivaci rostlin při použití Murashige-Skoog media.

V oblasti použitelných koncentrací byly konstruovány fytoextrakční křivky. Vlastní experiment byl prováděn tak, že v určitém stádiu kultivace rostlin byl do media přidán roztok PCP a v definovaných časových intervalech byly odebrány vzorky media. V nich byla koncentrace PCP stanovena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na základě kalibrační závislosti standardu PCP. Fytoextrakční křivky mají velmi podobný průběh pro většinu testovaných rostlinných species. Po počátečním rychlém poklesu koncentrace PCP v mediu nastává pomalejší fáze úbytku PCP. Větší rozdíly jsou v závislosti na použité koncentraci. Zatímco při nízkých koncentracích dochází k úbytku až na koncentrace pod 2,5 mg/l u vyšších koncentrací se projevuje pouze první rychlá fáze poklesu koncentrace, načež její hodnota ve zbylém testovacím období stagnuje, či dokonce mírně vzrůstá. Vysvětlení je nasnadě, xenobiotikum v použité koncentraci poškozuje tkáňové struktury a enzymatické systémy, jejichž vyčerpání vede k stagnaci biotransformace. Poškozené či odumřelé tkáně pak mohou uvolnit část vázaného PCP a tím nepatrně zvýšit jeho koncentraci v mediu. Fytoextrakční křivky PCP pro pelušku jarní jsou uvedeny na obr. 3



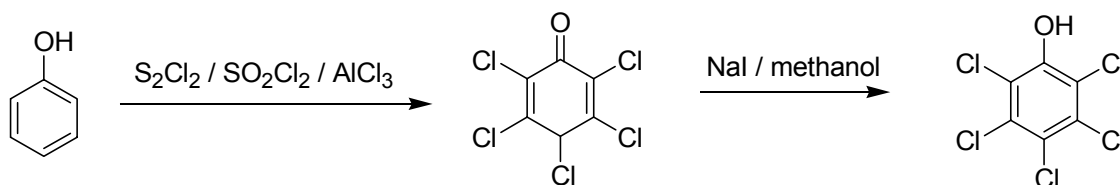
3 Fytoextrakční křivky extrakcí PCP peluškou jarní.
(In vitro kultivace na Murashige-Skoog mediu, stanovení koncentrace pomocí HPLC/UV 242 nm).

Po provedení extrakčních experimentů bylo analyzováno jak medium, tak i homogenáty použitých rostlin či jejich částí. U analýz media se předpokládala alespoň minoritní přítomnost glukosidu pentachlorofenolu, který byl nalezen Harmsem [19] při metabolických pokusech se suspenzními kulturami. Za tímto účelem byl synteticky připraven standard pentachlorofenol- β -D-glukopyranosidu, nicméně tato látka nebyla v mediu prokázána a její tvorba a vyloučení do media je zřejmě vlastností nediferencovaných buněk. S tvorbou metabolitů úzce souvisí i aktivita enzymů přítomných v rostlinných tkáních. Za tímto účelem byla stanovena aktivita vybraných enzymů v homogenátech tkání rostlin vystavených expozici PCP. Prvním sledovaným enzymem byla peroxidasa, která

je obecně považována za hlavní rostlinný detoxikační systém pro xenobiotika. Ke sledování metabolického stavu rostliny jsme využili enzym fosfoenolpyruvatkarboxylasu, který je součástí fotosyntetického komplexu reakcí. Stanovení glukosidasy bylo provedeno vzhledem k výše citovanému podezření tvorby PCP-glukosidu, který by mohl být uvolňován zpět do rhizosféry. Navíc ještě k zhodnocení metabolismu bylo stanoveno množství chlorofylu. Většina těchto pokusů byla prováděna s rostlinami kukuřice kultivovanými na mediích s různým množstvím PCP. Získané hodnoty enzymových aktivit ukázaly, že do koncentrace 15 mg/l se zvyšuje aktivita peroxidasy i fosfoenolpyruvat karboxylasy, což svědčí o probíhajícím metabolismu PCP. Naopak množství glukosidas se stoupající koncentrací klesá, stejně jako množství chlorofylu. Z toho lze usoudit, že i přes vnější bezproblémový růst je základní metabolismus rostliny napadán použitým xenobiotikem.

Studium obsahových látek rostlinných homogenátů získaných ze species kultivovaných na mediu s PCP přineslo několik zajímavých informací. První z nich bylo poměrně malé množství volného PCP a dále nepřítomnost výrazného množství nějakého metabolitu. Všechna tato fakta podporují předpoklad, že pokud vůbec dochází k nějaké výraznější biotransformaci, tak produkty jsou velmi rychle ukládány v neextrahovatelné formě.

Další výzkum se proto prováděl s radioaktivně značeným PCP. Vzhledem k jeho komerční nedostupnosti bylo nutno provést jeho syntézu z dostupného [^{14}C]fenolu. I když značný pentachlorfenol byl již v obdobných studiích několikrát použit, jeho příprava je v publikacích popsána jen velmi rámcově a i podrobněji popsané postupy [20,21] používají metodiku obdobnou průmyslové výrobě a nepříliš vhodnou pro radiochemickou syntézu, tj. chlorace fenolu plynným chlorem za katalýzy chloridem hlinitým. Z tohoto důvodu byla vypracována nová metoda přípravy za použití Ballester-Molinet-Castanerova činidla [22], která probíhá v roztoku, bez použití plynného chloru a zároveň poskytuje velmi dobré chemické výtěžky s minimálním znečištěním nížechlorovanými produkty. Reakce je aplikovatelná i na radiochemický experiment, byla provedena jak v provedení s nosičem, tak i v provedení beznosičovým. V neaktivním experimentu byl chemický výtěžek 63 %, v aktivních experimentech bylo dosaženo radiochemických výtěžků 47 % v provedení s nosičem, a 33 % v provedení beznosičovým. Schéma reakce je uvedeno na obr. 4



Obr. 4 Schema přípravy [U- ^{14}C]pentachlorofenolu. Meziprodukt pentachlor-2,5-cyklohexadien-1-on byl v neaktivním experimentu izolován a identifikován. Vlastní příprava probíhá bez izolace meziproduktu.

S připraveným značeným pentachlorfenolem byla provedena řada experimentů. Orientační fytoextrakční experimenty prokázaly shodu s experimenty neaktivními. V návaznosti na tyto pokusy byla stanovena distribuce radioaktivity v kořenové a nadzemní části rostliny a to jak měření jednotlivých segmentů rostliny pomocí LSC, tak i elektronickou autoradiografií. Výsledky jednoznačně prokázaly transport extrahovaného xenobiotika do nadzemních orgánů. Vzhledem k předpokladu, že PCP či jeho metabolity jsou ukládány do ligninových částí buněčné stěny, byly rostlinné tkáně homogenizovány a buněčné stěny izolovány. Při tomto experimentu se potvrdil předpoklad, že většina inkorporované aktivity se nachází právě v buněčné stěně. Abychom dále potvrdili, že PCP či jeho metabolity se účastní stavby ligninové části buněčné stěny, byl proveden pokus o delignifikaci, při kterém dochází ke štěpení ligninu a převedení do rozpustné formy. I v tomto případě se ukázal předpoklad jako správný a většina aktivity po delignifikační reakci přešla do roztoku.

Na základě experimentů s radioaktivně značeným pentachlorfenolem lze tedy konstatovat, že ať už PCP podléhá metabolickému zpracování v rostlině z větší či menší míry, je jednoznačně distribuován i do nadzemních částí rostlin, kde se inkorporuje do ligninových částí buněčné stěny ve formě neextrahovatelného residua.

5. Literatura

1. Cunningham S.D., Ow D.W.: *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 719.
2. Watanabe M.E.: *Environ. Sci. Technik.* **1997**, *31*, 182A.
3. Schnoor J.L., Licht L. A., McCutcheon C.S., Wolfe N.L., Carreira L.H.: *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 318.
4. Miller R.: *Phytoremediation, Technology Overview Report, Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, Series O, Vol. 3., 1997 Data v publikaci Summary of Bioremediation Techniques* : <http://www.hawaii.edu/abrp/Technologies/phytran.html>.
5. Simonich S.L., Hites R.A., *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2905.
6. Broadley M.R., Willey N.J.: *Environmental Pollution* **1997**, *97*, 11.
7. Brown S.L., Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M: *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, *8*, 279.
8. Entry J.A., Watrud L.S.: *Water Air Soil Pollut.* **1998**, *104*, 3.
9. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Chem. Listy* **2001**, *95*, 212.
10. Marrs K.A.: *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **1996**, *47*, 127.
11. Coleman J.O.D., Blahe-Kalff M.M.A., Davies T.G.E.: *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 146.
12. Lee J., Reeves R.D., Brooks R.R., Jaffré T.: *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1503.
13. a) Grill E., Gekereel W., Winnacker E.L., Zenk M.H.: *FEBS Letters* **1986**, *205*, 47; b) Klapheck S., Schulz S., Bergmann L.: *Plant Physiology* **1995**, *107*, 515; c) Neuwly P., Thibault P., Rauser W.E.: *FEBS Letters* **1993**, *336*, 472.
14. Kagi J.H.R.: *Metallothionein III* (Editoři: Suzuki K.T., Imura N., Kimura M.), Birhauser, Basel **1993**.
15. Schnoor J.L.: *Phytoremediation, Technology Evaluation Report, University of Iowa. Vydáno u Ground Water Remediation Technologies Analysis Center, Pittsburgh 1997*, <http://www.gwrtac.org>.
16. Nichols T.D., Wolf D.C., Rogers H.B., Beyrouthy C.A., Reynolds C.M.: *Water Air Soil Pol.* **1997**, *95*, 165.
17. Peart V.: *Indoor Air Quality in Florida: Houseplants to Figur Pollution*. University of Florida **2003**, <http://edis.ifas.ufl.edu/>.
18. Murashige T., Skoog F.: *Phys. Plantarum* **1962**, *15*, 473.
19. Langebartels C., Harms H.: *Z. Pflanzenpfysiologie* **1984**, *113*, 201.
20. Bubner M., Schmidt L.H.: *Kernenergie* **6(2) 1963**, *Chem. Abstr.* *61*, 14657d **1964**.
21. Rogers R.R., Christian J.E., Etzel J.E., Born G.S.: *Labelled Compd.* **1970**, *7*, 149 - 153.
22. Ballester M., Molinet C., Castaner J.: *J. Amer. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 454.

6. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Narozen 29. 12. 1956 v Prostějově

Bydliště: Za Jalovým Dvorem 854/13, 142 00 Praha 4

Zaměstnavatel: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Pracoviště: Katedra organické a jaderné chemie, oddělení jaderné chemie

1976 – 1981 – studium chemie na VŠCHT v Praze, specializace organická chemie, diplomová práce: Syntéza chirálních fosfinových ligandů (školitel prof. Červinka)

1981 – 1985 – vědecká aspirantura na Katedře organické chemie VŠCHT; kandidátská práce „Studium redukcí prochirálních substrátů modely NADH“ obhájena v r. 1986 (školitel prof. Červinka)

od 1986 – odborný asistent na Katedře organické a jaderné chemie PŘF UK
1990 – studijní pobyt (DAAD) na univerzitě v Heidelbergu- Institut farmaceutické biologie

od 1993 – tajemník katedry organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze

od 2003 – pověřen vedením katedry organické a jaderné chemie PŘF UK

Během svého působení na katedře jsem byl školitelem úspěšně obhájených 12 diplomových a 10 bakalářských prací. V rámci výuky zajišťuji 6 přednášek z nichž bych rád uvedl Radionuklidy v biologii, Značené sloučeniny III (biosyntézy), Chemii léčiv a základní přednášku z organické chemie pro posluchače oboru Klinická a toxikologická analýza. Od začátku svého působení na PŘF UK vedu Praktikum z jaderné chemie. Získal jsem finanční podporu pro 5 grantových projektů, z nichž 4 byly granty FRVŠ a jeden pětiletý grant EU COST. Spolupracoval jsem na řešení projektu „Studium molekulární architektury a molekulárních interakcí biologicky významných proteinů (MŠMT VS96141) a jsem členem řešitelského kolektivu projektu „Vývoj radiochemických postupů přípravy radiofarmak (ÚJF AV ČR). V současné době jsem členem oborové rady doktorského studia organické chemie na PŘF UK a VŠCHT Praze, členem přijímacích komisí do magisterského studia v oborech organická chemie, jaderná chemie a klinická a toxikologická analýza. V posledně jmenovaném jsem rovněž členem zkušební komise pro státní bakalářské zkoušky. V pedagogické oblasti jsem se rovněž podílel na vytvoření nové koncepce bakalářsko-magisterského studia v oborech organická chemie a jaderná chemie.

Ve vědecké práci jsem se zaměřil především na přípravu organických resp. značených sloučenin pro biochemické studie, část kapacity byla věnována studiu biosyntézy značených sloučenin v tkáňových kulturách vyšších rostlin: V posledních letech jsem se zaměřil na ekologickou problematiku ve smyslu teoretického studia fytoremediačních procesů ve vztahu k organickým polutantům a radionuklidům. V posledních pěti letech jsem spoluautorem 13 původních prací a 12 příspěvků na mezinárodních konferencích.

Z dalších aktivit bych rád uvedl, že jsem členem výboru odborné skupiny jaderné chemie ČSCH, dlouhodobě pracuji na excerpci literatury pro databázi Beilstein .