

Studium dopadu olovnatých iontů na cukrovku

STUDY OF EFFECTS OF LEAD IONS ON SUGAR BEET

Karel Stejskal^{1,2}, Václav Diopan¹, Vojtěch Adam¹, Josef Zehnálek¹, Libuše Trnková²,
Ladislav Havel², Michaela Galiová², Radek Malina³, Karel Novotný², Jozef Kaiser³, René Kizek¹

¹Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

²Masarykova univerzita v Brně

³Vysoké učení technické v Brně

Problém znečištění životního prostředí je stále více diskutovanou otázkou celého světa, mimo jiné i v souvislosti s rozličnými přírodními katastrofami. Míra znečištění zcela jistě souvisí s technologickým pokrokem, který proběhl v 19. a 20. století. Ten měl za následek obrovskou a nikým nekontrolovanou produkci cizorodých látek a sloučenin, se kterými si živé organismy nejsou schopny poradit přirozenými prostředky. Mezi známé a významné polutanty patří například polychlorované bifenyly, různé ropné produkty a v neposlední řadě těžké kovy, především toxické těžké kovy (olovo, rtuť, arzen, chrom, kadmium atd.) (1–4). Ionty toxických těžkých kovů mají negativní vliv na živé organismy na všech potravních úrovních (5–16).

Z hlediska ochrany životního prostředí je důležité najít vhodný nástroj k co nejefektivnějšímu odstranění toxických kovů ze znečištěných oblastí. Přitom je nutné brát ohled na základní přírodní ráz krajiny a přirozené rostlinné a živočišné biotopy v ní žijící. V současné době existují metody, které dokáží efektivně odstranit polutanty, ale jsou buď nešetrné k životnímu prostředí nebo ekonomicky nevýhodné. Například odtěžení několika tun zasažené zeminy a její následné spálení ve spalovně je z hlediska ochrany životního prostředí nejhorším scénářem, se kterým se můžeme setkat. A navíc je tento proces velmi finančně náročný. Objevit vhodnou a všeobecně uznávanou metodu či postup pro šetrnější způsob sanace znečištěného prostředí je velmi obtížnou záležitostí. Jak se zdá, vhodnou metodou by mohla být např. fytořemediace (17–20).

Fytořemediace je druh nápravné technologie, která využívá schopnosti vybraných zelených rostlin absorbovat polutanty různého druhu (organické i anorganické) a ty dále ukládat či degradovat ve svých pletivech. Polutanty jsou rostlinou převedeny na formy, které už nejsou schopny vstupovat do životního prostředí. Obecně řečeno, aby rostliny mohly přežít nepříznivé období, musely si vyvinout obranné mechanismy (21–23). V případě rostlin vystavených působení těžkých kovů je cestou jejich ochrany především syntéza thiolů (24). Thioly jsou látky obsahující ve své molekule jednu nebo více sulfhydrylových skupin (20), pomocí nichž na sebe váží toxické kovy, kdy dochází k nahrazení vodíku příslušným kovem (obr. 1.).

Všechny rostlinné druhy ovšem nejsou vhodné pro fytořemediaci, protože nedokáží přežít v přítomnosti vysokých koncentrací toxických sloučenin. Rostliny vhodné pro fytořemediace by měly být dobrými fytořemediátory (schopné pevně vyvázat sloučeninu do těla rostliny) a hyperakumulátory (mohou do svého těla absorbovat v krátké době poměrně velké množství kovu, aniž by jim kov extrémně škodil). Patří mezi ně hořčice, slunečnice, rýže a křídlatka. Tuto schopnost jim pravděpodobně umožňuje právě zvýšená syntéza látek obsahující thiolovou skupinu. Vhodný hyperakumulátor by měl být ale také schopen vyprodukovat poměrně velké množství biomasy. Ukládání toxických kovů by mělo být nejefektivnější v nadzemní části rostliny, která je snadno odstranitelná a může se dále účinně zlikvidovat např. ve spalovně bez možnosti dalšího úniku kovu do ovzduší (21–23).

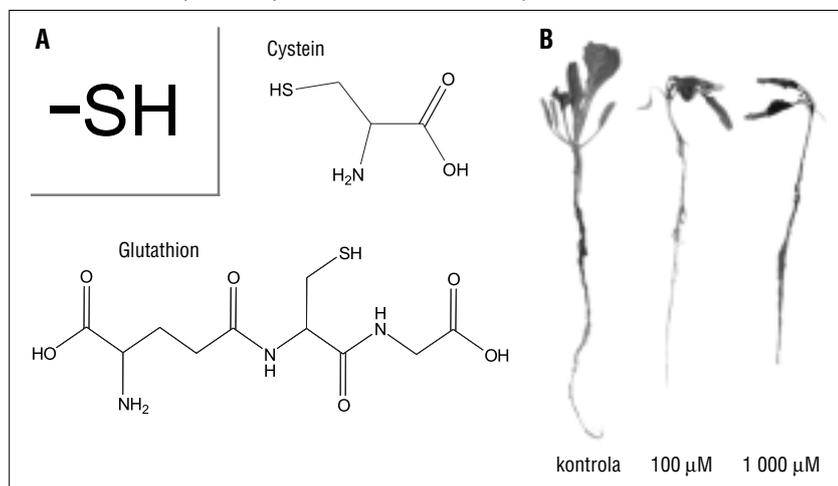
V našem experimentu byly vystaveny dvou-týdenní rostliny řepy cukrovky vlivu olovnatých iontů ve formě komplexu s EDTA. Byl sledován vliv těchto iontů na základní biologické ukazatele a na množství thiolů detekovaných pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

Materiál a metody

Chemikálie

Všechny použité chemikálie, pokud není uvedeno jinak, byly získány od firmy Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, USA) a byly ACS čistoty. Standardní roztoky byly připraveny rozpouštěním chemikálie v ACS vodě (Sigma-Aldrich, USA) a uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pracovní roztoky byly každý den naředěny ze standard-

Obr. 1. A – chemická struktura cysteinu a redukovaného glutathionu; B – fotografie rostlin exponovaných Pb-EDTA v 5. dni experimentu



ních roztoků ACS vodou. Všechny roztoky před HPLC analýzou byly filtrovány pomocí diskových nylonových filtrů s velikostí pórů 0,45 μm (Millipore, USA). Hodnota pH byla měřena na přístroji WTW inoLab Level 3 s řídicím modulem Level 3 (Weilheim, Německo) a kontrolována na osobním počítači programem Multi-Lab Pilot (Weilheim, Německo). pH elektroda (SenTix-H, pH 0 - 14/3 mol/dm³ KCl) byla pravidelně kalibrována pomocí WTW pufrů (Weilheim, Německo).

Kultivace rostlin

Semena cukrovky, odrůdy Roseta, byla vložena do misky s perlitem a dva týdny klíčila v kultivačním boxu (Sanyo, Japonsko) ve tmě při teplotě 20 °C a vlhkosti 60 %. Naklíčené rostliny byly umístěny jednotlivě do zkumavek s 25 ml živného roztoku podle RICHTERA (25). Takto připravené rostliny byly vloženy do kultivačního boxu a týden kultivovány při režimu 14 hodin světlo s intenzitou 8 000 luxů, teplota 25 °C a vlhkost 60 - 70 %. Režim noci trval 10 hodin a teplota klesla na 20 °C. Po uplynutí kultivační doby byly rostliny omyty a živný roztok vyměněn za roztoky Pb-EDTA o koncentracích 0, 100 a 1000 μM . Následný experiment trval 6 dnů za stejných podmínek jako předchozí kultivace. Rostliny byly odebrány v 0., 2. a 5. dni experimentu (obr. 1B). Následně byly omyty v destilované vodě, 0,5M roztoku EDTA, opět v destilované vodě a rozděleny na podzemní a nadzemní část. Takto upravené byly připraveny k dalšímu zpracování.

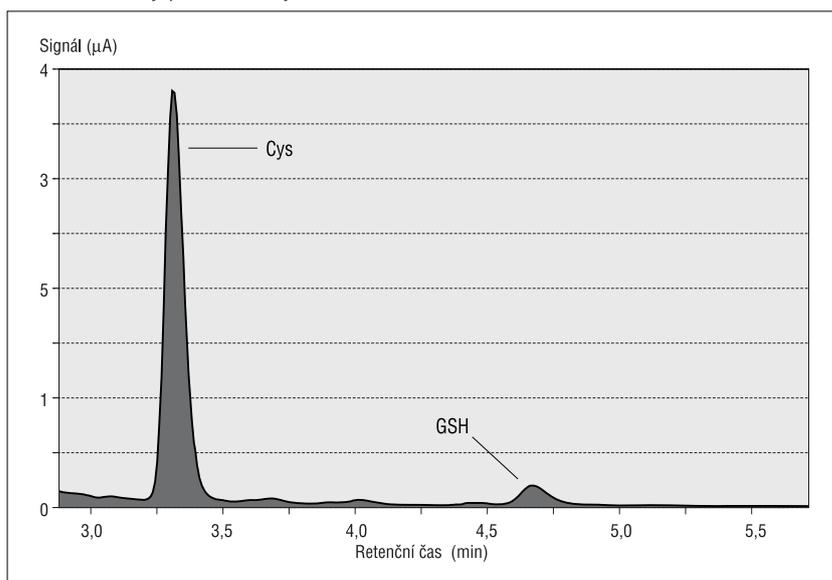
Příprava vzorků pro analýzu thiolů

Listy a kořeny řepy (průměrně 0,2 g svěží hmotnosti) byly zmrazeny kapalným dusíkem z důvodu destrukce buněk. Zmražené části rostlin byly rozetřeny v třecí misce a poté byly do misky přidány 2 ml fosfátového pufru o pH 7,0. Vzniklý roztok byl homogenizován pomocí třepání na Vortex-2 Genie (Scientific Industries, USA) po 45 min při 4 °C. Homogenát byl centrifugován (3 000 g) 30 min při 4 °C pomocí centrifugy Universal 32 R (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo).

Vysoce účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Přístroj vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) byl složen ze dvou chromatografických čerpadel Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, Massachusetts, USA) (pracovní rozsah 0,001 - 9,999 ml/min), chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A (Varian Inc., California, USA) (150 \times 4,6; 3 μm velikost částic) a dvanáctikanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen z dvanácti průtočných analytických komůrek (Model 6210, ESA, USA) obsahující referenční (hydrogen paládiová), pomocnou a porézní grafitovou elektrodu. V řídicím modulu je uložena chromatografická kolona a elektrochemický detektor. Prostor byl termostátován na 30 °C. Jednotlivé vzorky byly injektovány autosamplerem (Mo-

Obr. 2. HPLC-ED chromatogram vzorku kořene řepy cukrovky exponované 100 μM Pb-EDTA ve druhém dni experimentu – mobilní fáze byla 80 mM TFA, aplikovaný potenciál byl 900 mV



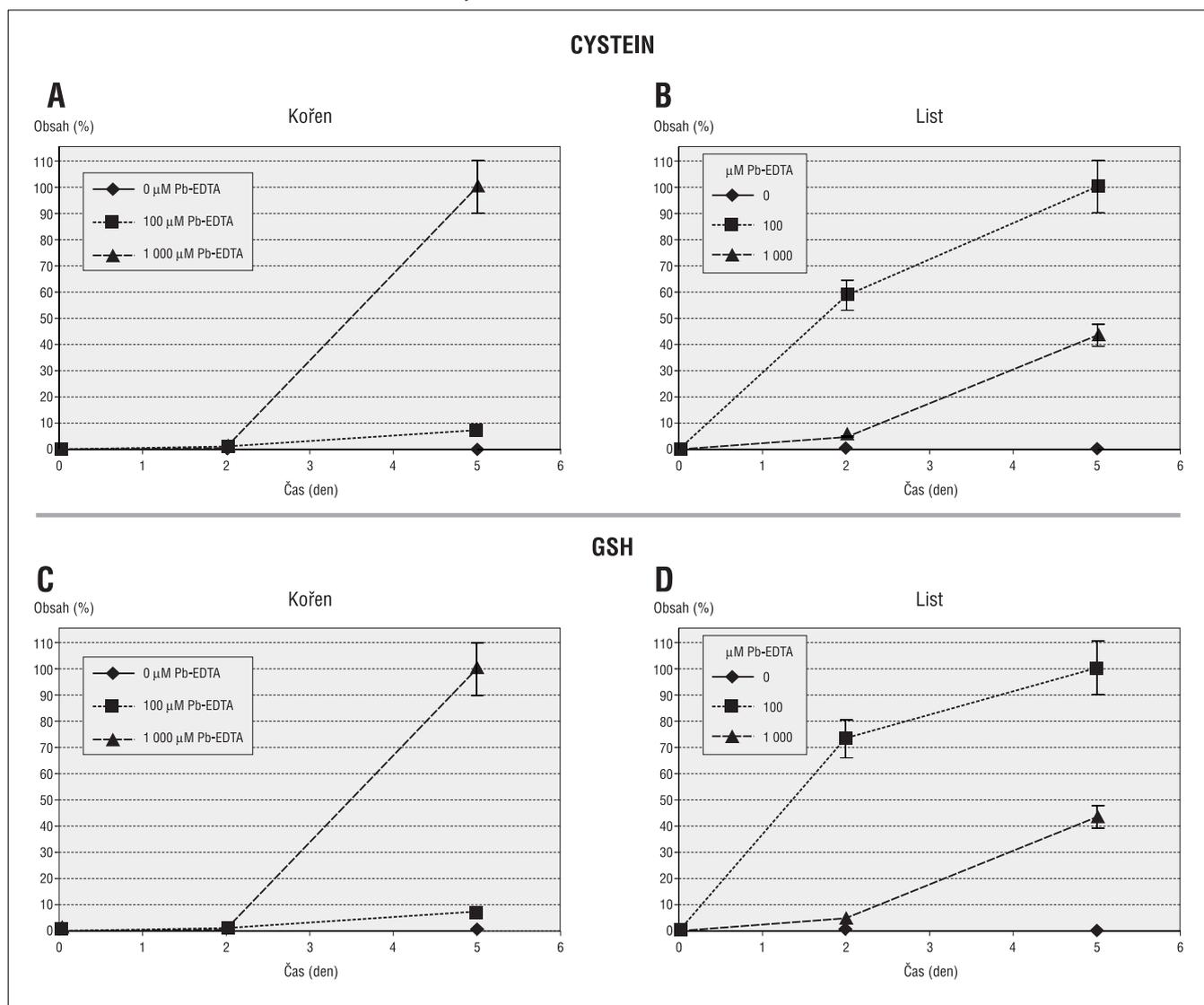
del 542, ESA, USA) při teplotě 4 °C. Injektovaný objem byl 50 μl . Detailnější popis experimentální aparatury je uveden v pracích (26, 27).

Výsledky a diskuse

Rostliny syntetizují celou skupinu thiolových sloučenin jako ochranu před působením toxických kovů. Zjistili jsme, že velice selektivní metodou pro stanovení elektroaktivních thiolů je vysoce účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) (26, 27). Kapalinová chromatografie umožní rychle separovat jednotlivé thiole, které jsou následně pomocí elektrochemického detektoru selektivně a senzitivně stanoveny.

V naší předchozí práci jsme pomocí elektrochemických technik zjistili, že rostliny kukuřice (*Zea mays*) vystavené působení kadmennatých iontů transportovaly značné množství kovu do nejstarších listových pater, jež postupem času odpadávají (28). A zároveň tyto rostliny produkovaly až o stovky procent více obranných thiolových látek v porovnání s kontrolou. V předkládané práci jsme využili optimalizovanou techniku HPLC-ED pro analýzu částí rostlin řepy vystavených působení Pb-EDTA. U rostlin řepy byly sledovány změny obsahu cysteinu (Cys) a redukovaného glutathionu (GSH), jak je ukázáno na obr. 2. Aminokyselina cystein je biologicky velmi významnou látkou. Nejprve jsme sledovali změny obsahu Cys v nadzemní i podzemní části rostlin. Obsah Cys se v kořenech v 0. a 2. dni experimentu prakticky nezměnil (zvýšení obsahu asi o 1 %). Mezi 2. a 5. dnem došlo k nárůstu obsahu Cys o 8 % u rostlin vystavených koncentraci 100 μM Pb-EDTA a téměř o 90 % u koncentrace 1 000 μM Pb-EDTA v porovnání s kontrolou. V listech se procentuální obsah Cys ve 2. dni u koncentrace 100 μM EDTA zvětšil asi o 50 % a u koncentrace 1 000 μM Pb-EDTA byl nárůst asi jen o 5 %. Zvýšení obsahu Cys v jednotlivých částech rostlinného těla je pravděpodobně způsoben značnými nároky organismu na syntézu thiolů, vyčerpáním přirozených zásob a nutností syntézy dalších molekul Cys (obr. 3.).

Obr. 3. A – změny procentuálního obsahu cysteinu (Cys) v kořenné části rostliny exponované 0, 100 a 1 000 μM Pb-EDTA; B – procentuální obsah Cys v nadzemní části (list) rostliny; C – procentuální obsah glutathionu (GSH) v kořenné části rostliny; D – procentuální obsah GSH v nadzemní části rostliny



Redukovaný GSH se v závislosti na dni expozice v kořenech řepy zvyšoval s rostoucí koncentrací aplikovaného chelátu olova. Největší nárůst byl u rostlin vystavených působení 1 000 μM Pb-EDTA. V nadzemní části se obsah GSH nejvíce zvýšil u rostlin exponovaných 100 μM , a to asi o 75 %. Tato koncentrace je pro rostlinu ještě stimulující, a zrychluje její metabolismus. Koncentrace 1 000 μM Pb-EDTA v 5. dni experimentu způsobuje u obou stanovených thiolů obsažených v nadzemní části výraznou inhibici jejich množství, což pravděpodobně souvisí s celkovým stavem rostlin (obr. 3.). Rostliny byly již celkově vyčerpané a jejich obranné mechanismy byly pravděpodobně velmi poškozené. Pomocí speciálních fyzikálních technik (spektrometrie laserem indukovaného plazmatu – LIBS) (29–31) jsme dále zjistili, že množství olova v listech řepy bylo v jeho různých částech přibližně rovnoměrné.

Závěr

HPLC-ED analýza cysteinu (Cys) a redukovaného glutathionu (GSH) ukázala na výrazné změny množství thiolů v kořenné

a nadzemní části rostlin řepy cukrovky exponovaných olovnatými ionty. Rostliny byly schopny při experimentu přežít expozici značné koncentrace toxického kovu (Pb). Vyšší koncentrace a také dlouhá doba expozice pak ovlivňují fyziologické funkce rostliny i její samotný vzhled (celková ochablost rostlin, růstová deprese jak kořenné, tak nadzemní části).

Poděkování: Práce byla podporována grantovými projekty: GAČR 522/07/0692, INCHEMBIOL MSMT 0021622412, MSM 0021630508 a MSM 0021622411.

Souhrn

Byl studován vliv chelátu olovnatých iontů (0, 100 a 1 000 μM) na obsah cysteinu a glutathionu u rostlin řepy cukrovky. Množství cysteinu i glutathionu v kořenech nejdříve narůstalo velmi pozvolna, přičemž od druhého dne došlo k strmému nárůstu. Proti tomu v listech docházelo k nárůstu obou sledovaných thiolů postupně v závislosti na době expozice Pb-EDTA.

Literatura

- ADAM V. ET AL.: Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy-metal ion biosensor. *Sensors*, 5, 2005 (1/2), s. 70–84.
- HUSKA D. ET AL.: A sensor for investigating the interaction between biologically important heavy metals and glutathione. *Czech J. Anim. Sci.*, 52, 2007 (2), s. 37–43.
- ZEHNÁLEK J. ET AL.: Assimilation of nitrate, ammonium and amide nitrogen by agricultural crops. *Chem. listy*, 100, 2006 (7), s. 508–514.
- PETREK J. ET AL.: Application of computer imaging, stripping voltammetry and mass spectrometry to study the effect of lead (Pb-EDTA) on the growth and viability of early somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* L./Karst.). *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 2005 (4), s. 576–586.
- BIBI M. ET AL.: Effect of copper and lead on photosynthesis and plant pigments in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 74, 2005 (6), s. 1126–1133.
- ESPER B. ET AL.: Photosynthesis as a power supply for (bio-)hydrogen production. *Trends Plant Sci.*, 11, 2006 (11), s. 543–549.
- STIBOROVÁ M. ET AL.: Effect of Heavy-Metal Ions on Growth and Biochemical Characteristics of Photosynthesis of Barley and Maize Seedlings. *Biol. Plant.*, 29, 1987 (6), s. 453–467.
- STIBOROVÁ M. ET AL.: Effect of Heavy-Metal Ions on Growth and Biochemical Characteristics of Photosynthesis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Photosynthetica*, 20, 1986 (4), s. 418–425.
- STIBOROVÁ M. ET AL.: Effect of Heavy-Metal Ions on Barley Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 52, 1987 (2), s. 525–533.
- STIBOROVÁ M. ET AL.: A Comparative-Study of the Effect of Heavy-Metal Ions on Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 181, 1986 (6), s. 373–379.
- STIBOROVÁ M. ET AL.: Effect of Ions of Heavy-Metals on the Photosynthetic Characteristics of Maize (*Zea mays* L.). *Biologia*, 41, 1986 (12), s. 1221–1228.
- STIBOROVÁ M. ET AL.: Heavy-Metal Inactivation of Maize (*Zea mays* L.) Phosphoenolpyruvate Carboxylase Isoenzymes. *Photosynthetica*, 19, 1985 (4), s. 500–503.
- STIBOROVÁ M. ET AL.: Mechanism of Action of Heavy-Metals, S-Triazine Herbicides and Nitrates on Alcohol-Dehydrogenase from Rape. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 51, 1986 (8), s. 1781–1788.
- VACEK J. ET AL.: Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture. *Bioelectrochemistry*, 63, 2004 (1/2), s. 347–351.
- VÍTEČEK J. ET AL.: Application of fluorimetric determination of sterases in plant material. *Chem. listy*, 99, 2005 (7), s. 496–501.
- VÍTEČEK J. ET AL.: A fluorimetric sensor for detection of one living cell. *Sensors*, 7, 2007 (3), s. 222–238.
- MEAGHER R. B.: Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 2000 (2), s. 153–162.
- SALT D. E. ET AL.: Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 1998 s. 643–668.
- CHANEY R. L. ET AL.: Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 1997 (3), s. 279–284.
- SALT D. E. ET AL.: Phytoremediation – a Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Bio-Technology*, 13, 1995 (5), s. 468–474.
- ZEHNÁLEK J. ET AL.: Influence of heavy metals on production of protecting compounds in agriculture plants. *Listy cukrov. a řep.*, 120, 2004 (7/8), s. 222–224.
- ZEHNÁLEK J. ET AL.: Application of higher plants in phytoremediation of heavy metals. *Listy cukrov. a řep.*, 120, 2004 (7/8), s. 220–221.
- ZITKA O. ET AL.: Utilizing electrochemical techniques for detection of biological samples. *Chem. listy*, 101, 2007 (3), s. 225–231.
- KLEJDUŠ B. ET AL.: Sub-picomole high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric determination of glutathione in the maize (*Zea mays* L.) kernels exposed to cadmium. *Anal. Chim. Acta*, 520, 2004 (1/2), s. 117–124.
- RICHTER O.: Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Kulturgräser. I. Über das grosse Eisenbedürfnis der Reispflanze (*Oriza sativa* L.). *Sitz.-Ber. Akad. Wiss.*, 1926 s. 203–242.
- POTĚŠIL D. ET AL.: Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.*, 1084, 2005 (1/2), s. 134–144.
- PETROVÁ J. ET AL.: Simultaneous determination of eight biologically active thiol compounds using gradient elution-liquid chromatography with Coul-Array detection. *J. Sep. Sci.*, 29, 2006 (8), s. 1166–1173.
- SUPÁLKOVÁ V. ET AL.: Electroanalysis of plant thiols. *Sensors*, 7, 2007 (6), s. 932–959.
- KAISER J. ET AL.: Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. *Microsc. Res. Tech.*, 70, 2007 (2), s. 147–153.
- NOVOTNÝ K. ET AL.: The use of zinc and iron emission lines in the depth profile analysis of zinc-coated steel. *Appl. Surf. Sci.*, 253, 2007 (8), s. 3834–3842.
- SAMEK O. ET AL.: Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples. *Laser Phys. Lett.*, 3, 2006 (1), s. 21–25.

Stejskal K., Diopan V., Adam V., Zehnálek J., Trnková L., Havel L., Galiová M., Malina R., Novotný K., Kaiser J., Kizek R.: Study of effects of lead ions on sugar beet

In the present paper the changes of cysteine and glutathione content at sugar beet plants treated with lead chelate (0, 100 and 1 000 μM) were determined. The content of cysteine and glutathione in roots increased gradually at the beginning of the treatment, whereas sharp increase in the content of both thiols was observed from the second day of the treatment. On the other hand the content of the thiols in leaves enhanced with dose of the lead ions and time of the treatment proportionally.

Keywords: lead, sugar beet, protective mechanisms of plants, thiols, high performance liquid chromatography with electrochemical detection.

Kontaktní adresa – Contact address:

doc. Ing. René Kizek, Ph. D., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: kizek@sci.muni.cz

