

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

**Stresové reakce rostlin po expozici nanočásticím oxidů
kovů**

**Stress reactions of plants following metal oxide nanoparticle
exposure**

Autor:

Eva Olšovská

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.

Datum odevzdání bakalářské práce:

15.5.2017

VŠB - Technická univerzita Ostrava
Univerzitní studijní programy
Centrum nanotechnologií

Zadání bakalářské práce

Student: **Eva Olšovská**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: **Stresové reakce rostlin po expozici nanočásticím oxidů kovů**
Stress reactions of plants following metal oxide nanoparticle exposure

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

Spolu se vzrůstající produkcí nanomateriálů, vzrůstá pravděpodobnost úniku těchto nanomateriálů do životního prostředí při jejich aplikaci a zejména při jejich produkci. Rostliny do interakce s nanomateriály vstupují nejen jako organismy, které může expozice nanočásticím negativně ovlivnit, ale rovněž jako možné biomonitory jejich přítomnosti v životním prostředí. Aby byl konkrétní druh využitelný jako biomonitor, je třeba nejen, aby zájmovou látku akumuloval ve svém těle, ale také aby zároveň nebyl její koncentrací nijak negativně ovlivněn. Cílem bakalářské práce je stanovení míry fyziologického stresu v buňkách známého biomonitoru *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. po expozici suspenzi nanočástic oxidu zinečnatého o známé koncentraci. Jako indikátor stresu bude použit obsah kyseliny askorbové ve stélce mechu. Studentka se v průběhu práce zaměří na následující okruhy:

- 1) Literární rešerši odborných textů se zaměřením na problematiku vlivu nanočástic oxidů kovů na rostliny a změny – zejména fyziologické – které v tělech rostlin způsobují.
- 2) Sběr a příprava vzorků mechorostu *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. pro laboratorní experimenty.
- 3) Expozici vzorků suspenzím nano-ZnO o známých koncentracích v kombinaci s různými způsoby úpravy vzorku (mytí X nemytí před expozicí, sušení X nesusušení před expozicí, sušení x nesusušení po expozici).
- 4) Stanovení obsahu kyseliny askorbové ve vzorcích jako indikátoru fyziologického stresu.
- 5) Zhodnocení získaných výsledků vzhledem k problematice vlivu znečištění nanočásticemi na rostliny s použitím základních metod statistické analýzy získaných výsledků v programu R.

Seznam doporučené odborné literatury:

GLIME, J.M. Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology. [online] [cit. 2016-10-10] <<http://www.bryocol.mtu.edu/>>.

CHAKRABORTTY, S. a PARATKAR, G.T., 2006: Biomonitoring of trace element air pollution using mosses.-Aerosol and Air Quality Research, 3:247-258.

KAHRU, A., DUBOURGUIER, H.-C., 2010, From exotoxicology to nanoecotoxicology.-Toxicology, 269: 105-119.

MARKERT, B. A., A. M. BREURE a Harald G. ZECHMEISTER (eds.). 2003. Bioindicators: principles, concepts and applications. 1st ed. Amsterdam: Elsevier. Trace metals and other contaminants in the environment, vol. 6. ISBN 00-804-4177-7.

REMÉDIOS, C.; ROSÁRIO, F.; BASTOS, V., 2012, Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects.-Journal of Botany, 2012: 8 pp.

SIDDIQUI, Manzer H., Mohammed H. AL-WHAIBI a Firoz MOHAMMAD (eds.). 2015. Nanotechnology and plant sciences. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 303 s. ISBN 978-331-9145-013.


WOLTERBEEK, B., 2002: Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives.-Environmental Pollution, 120:11-21.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.**

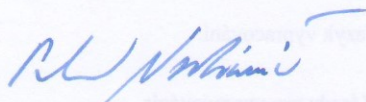
Datum zadání: 20.10.2016

Datum odevzdání: 15.05.2017



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry





prof. Ing. Petr Noskiewicz, CSc.
prorektor pro studium

Prohlašuji, že:

- Celou bakalářskou práci včetně příloh jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu. Byla jsem seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB-TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 ods. 3).
- Souhlasím s tím, že bakalářská práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB-TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci, nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněná v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 15. 5. 2017

Podpis:

Jméno a příjmení autora práce: Eva Olšovská

Adresa trvalého pobytu autora práce: Ženkla 283, 742 67

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Oldřichu Motykovi, PhD. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícný přístup při vypracování této práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Šárce Ratajové, DiS. a Lence Bardoňové za spolupráci s analýzou vzorků. A dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Janě Seidlerové, CSc., která celý tento projekt zajišťovala.

Anotace

Ke stanovení míry fyziologického stresu v buňkách známého biomonitoru *Pleurozium schreberi*, byla vybrána titrační metoda stanovení kyseliny askorbové. Obsah kyseliny askorbové bylo stanoveno ve vzorcích mechu, které byly po dobu pěti týdnů vystaveny suspenzi nanočástic ZnO, za pomoci 2 % kyseliny metafosforečné a titračního činidla 2,6-dichlorfenolindofenolu. Dále bylo rovněž sledováno ovlivnění míry vyvolaného stresu v závislosti na různých podmínkách, kterým byl mech během experimentu vystaven. Míra vyvolaného stresu byla u všech vzorků závislá jak na podmínkách experimentu, tak zdali vzorky byly exponovány nebo nikoli. Metoda je vhodnou částí biomonitoringu znečištění nanočásticemi.

Klíčová slova: *Pleurozium schreberi*, kyselina askorbová, titrační metoda, nano-ZnO, stres

Abstract

To determine the degree of physiological stress in the cells of the known biomonitor *Pleurozium schreberi*, the titration method for the determination of ascorbic acid was chosen. The ascorbic acid content was determined in moss samples that were exposed to a suspension of ZnO nanoparticles for 5 weeks with 2% metaphosphoric acid and 2,6-dichlorophenolindophenol titration reagent. In addition, the effect of the stress-induced rate was monitored, depending on the different conditions the moss experienced during the experiment. The rate of stress induced in all samples was dependent both on the conditions of the experiment and whether or not the samples were exposed. The method is a suitable part of biomonitoring of nanoparticle pollution.

Keywords: *Pleurozium schreberi*, ascorbic acid, titration, nanoparticles-ZnO, stress

Obsah

I ÚVOD	8
II A. TEORETICKÁ ČÁST	9
1 BIOMONITORING	9
2 MECHOROSTY	10
2.1 STAVBA MECHOROSTŮ	10
2.2 MECHY.....	11
3 NANOČÁSTICE A JEJICH INTERAKCE V ROSTLINÁCH	14
3.1 PŘÍJEM A POHYB NANOČÁSTIC ROSTLINOU	14
3.2 HROMADĚNÍ V ROSTLINNÝCH TKÁNÍCH	15
3.3 NANOČÁSTICE KOVŮ	16
4 STRES V ROSTLINÁCH	18
4.1 OXIDATIVNÍ STRES	19
4.2 STRES V ROSTLINÁCH VYVOLANÝ NANOČÁSTICEMI	21
5 KYSELINA ASKORBOVÁ	23
5.1 SYNTÉZA KYSELINY ASKORBOVÉ	24
5.2 VÝSKYT A LOKALIZACE.....	24
5.3 FUNKCE V ROSTLINÁCH.....	24
5.4 KYSELINA ASKORBOVÁ A REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	25
5.5 KYSELINA ASKORBOVÁ A REAKCE NA STRESOVÉ SITUACE	25
6 TITRAČNÍ METODA	27
III B. PRAKTICKÁ ČÁST	29
1 METODIKA	29
1.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL	29
2 EXPOZICE MECHU	31
2.1 PŘÍPRAVA SUSPENZE	31
2.2 EXPOZICE NANOČÁSTICEMI ZNO.....	32
2.3 ANALÝZA VZORKŮ	33
3 VÝSLEDKY	35
4 DISKUZE	41
IV ZÁVĚR	44
V POUŽITÁ LITERATURA	45
VI SEZNAM GRAFŮ	51
VII SEZNAM OBRÁZKŮ	52
VIII SEZNAM TABULEK	53
IX SEZNAM ZKRATEK	54

ÚVOD

Neustálý rozvoj průmyslu a nových technologií, zejména nanotechnologií má i odvrácenou stranu v podobě úniku nanočástic do životního prostředí v podobě emisí nebo odpadu, který produkuje. Tyto nanočástice jsou produkovány ve stále vyšší koncentraci a množství. Je velice dobře známo, že čím je částice menší, tím je pro ni samotnou mnohem jednodušší se dostávat a pronikat kamkoli, kde dopadne. Jako malý objekt je pro ni také snadné vytvářet interakce s podněty okolo sebe. Díky své velikosti, hmotnosti apod. mají odlišné vlastnosti než objekty stejného chemického složení, ale větších rozměrů. Z těchto důvodů je velmi důležité sledovat potenciální dopad nanočástic na životní prostředí. A to nejen množství v ovzduší, půdě, vodách, ale také jejich akumulaci, případný rozklad a interakce s živými organismy – jak živočichy, tak i rostlinami.

Do dnešního dne již proběhlo množství experimentů na toto téma. Avšak ve větší míře byly zaměřeny na toxický vliv nanočástic na člověka a živočišnou populaci obecně. Jen v menší míře byly tyto výzkumy zaměřeny i na rostliny. U rostlin byl výzkum zaměřen především na příjem, akumulaci, distribuci a uložení nanočástic v rostlině. Z hlediska reakce na působení cizorodých částic, je značný rozdíl mezi cévnatými a bezcévnými rostlinami. Hlavním důvodem je nepřítomnost vodivých pletiv a z toho vyplývající příjem živin a vody celým povrchem těla u bezcévných rostlin. Tyto odlišnosti mohou způsobit odlišnou reakci na expozici nanočásticím.

Cílem této práce je stanovení míry fyziologického stresu v buňkách známého biomonitoru *Pleurozium schreberi*, jenž se řadí k mechorostům. Dále stanovení stresu po expozici suspenzi nanočástic ZnO a následné srovnání se vzorky neexponovanými, kdy indikátor stresu byl obsah kyseliny askorbové ve stélce mechu. A nakonec zhodnocení získaných výsledků a případná doporučení pro biomonitoring znečištění nanočásticemi.

A. TEORETICKÁ ČÁST

1 Biomonitoring

Biomonitoring představuje slibnou ekologickou metodu pro zjišťování výskytu a následné distribuce znečišťujících látek v životním prostředí. V životním prostředí se vyskytuje stále více nanočástic vytvořených především lidskou činností, v menší míře se vyskytují i nanočástice přírodního původu. Je tedy důležité sledovat jejich případný dopad na životní prostředí. Díky shromažďování těchto informací se snažíme docílit poznání nejen v oblasti možného dopadu lidské činnosti na přírodu jako celek, ale zjišťuje se také ovlivnění a dopad na člověka. Sledování probíhá nepřímou metodou, kdy se nejprve zjišťuje potenciální vliv na rostliny a organismy, a teprve potom se tato informace přenesou i na člověka. (Sytar, b.r.)

Setkáváme se zde s pojmy bioindikátor, což je organismus nebo chemikálie využívaná k posouzení stavu životního prostředí nebo ekosystému. Jako bioindikátor se využívají jednotlivé organismy a jejich části, nebo celé populace organismů, které poskytují informaci o kvalitě životního prostředí. S tímto souvisí také pojem biomonitor, kdy se využívají jednotlivé organismy či jejich části nebo celé populace. Díky němu dostáváme informaci o kvantitativních aspektech životního prostředí. Důležitým faktem je skutečnost, že biomonitor je vždy současně i bioindikátor, avšak naopak to platit nemusí. (Markert, 2007)

Podle reakce organismu na znečištění v životním prostředí se rozlišují biomonitory na akumulační a senzitivní. Díky akumulačním biomonitorům zjišťujeme, které látky jsou schopny v organismu akumulovat, zato díky senzitivním biomonitorům zjišťujeme jednotlivé výsledky reakcí na expozici z dané látky. Jednotlivé účinky se mohou projevit změnou v morfologii, histologii, buněčné struktuře, metabolicko-biochemických procesech a struktuře organismů. Podle způsobu příjmu, uchování, akumulace, reakcí a spoustě dalších faktorů se biomonitory postupně dále rozdělují a specifikují. (Markert, 2007)

Organismy, které jsou pro biomonitoring vhodné, jsou mimo jiné mechorošty, a to zejména proto, že jsou evolučně jiným způsobem přizpůsobené pro hospodaření s vodou. Jejich hlavní rozdíl od ostatních rostlin je v tom, že nemají vodivá pletiva (řadí se ke skupině

bezcévných rostlin). To způsobuje, že nemohou přijímat vodu a živiny kořeny, jako cévnaté rostliny, ale přijímají je celým povrchem těla z atmosférické vlhkosti. (Váňa, 2006)

Biologické monitorování kvality ovzduší může být provedeno dvěma způsoby – aktivně a pasivně. Pro aktivní monitorování je podstatný transport mechu z jeho přirozeného prostředí (nejlépe neznečištěného prostředí) na studované místo. A pasivní monitorování je takové, kdy je studovaný organismus již k dispozici na studovaném místě. (Sytar, b.r.)

2 Mechorosty

První experiment spojený s mechorosty je datován roku 1968, kdy byl využit mech pro sledování znečištění olovem v životním prostředí. (Ruhling, 1968)

Simon Levin roku 1992 představil na své přednášce (The problem of pattern and scale in ecology) svou vizi využití mechorostů pro sledování ekosystémových procesů. Podotkl, že člověk využíval mechorosty po tisíciletí v zahradnictví, pohonných hmotách nebo při masivním odstraňování ropných skvrn. Ale nyní díky znečištění ovzduší některé druhy vymizely. Tímto se mechorosty ukázaly jako indikátor hrozícího poškození ekosystémů. Tímto navázal na přednášku Roberta MacArthura (Ecological Society of America, August 1989). (Levin, 1992)

Mechorosty se řadí mezi jedny z nejstarších suchozemských rostlin, které vznikly ze zelených řas. Představují parafyletickou skupinu rostlin, zahrnující tři samostatná oddělení: mechy (*Bryophyta*), játrovky (*Marchantiophyta*) a hlevíky (*Anthocerotophyta*). Celkový počet mechorostů je kolem 16–20 tisíc druhů, které se vyskytují po celém světě. (Váňa, 2006)

2.1 Stavba mechorostů

2.1.1 Stavba buněk

Základní stavební jednotkou rostlinného organismu je rostlinná buňka. Ta patří mezi eukaryotické buňky, tedy obsahuje genetickou informaci ve formě chromozómů obalených dvojitou jadernou membránou. (Ušakova, 1999)

Buněčná stěna mechorostů je celulózní a je tvořena dvěma nebo třemi bezbarvými vrstvami (jen u výjimek mohou být zbarveny přítomností pigmentu). Povrchová struktura buněčné stěny je strukturovaná v podobě papil různého tvaru. Někteří zástupci mají v buněčné stěně póry velkých rozměrů. (Váňa, 2006)

Buňka obsahuje jedno jádro, vakuoly (různé velikosti), čočkovité chloroplasty, škrobová zrna, mitochondrie a další organely charakteristické pro zelené rostliny. Další organely v buňce, jsou charakteristické dle druhu mechorostu. U játrovek přibudou siličná tělíska obklopená membránou, u mechů se vyskytují kulovité kapičky silic. (Váňa, 2006)

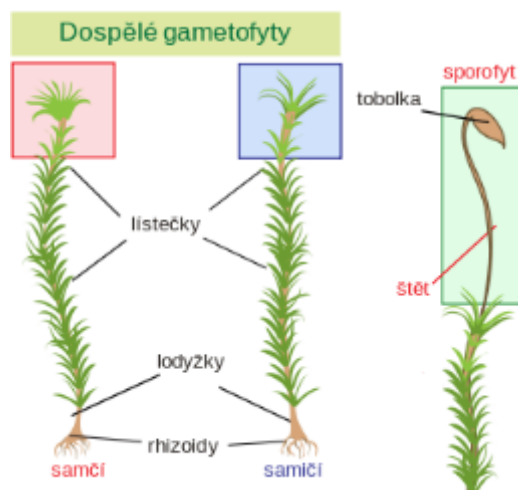
2.1.2 Stavba těla

Mechorosty jsou tvořeny přichytnými vlákny, lodyžkou a lístky. Z lodyžky vyrůstá štět s tobočkou, ve které jsou výtrusy. (Pilous, 1960)

2.2 Mechy

Mechy (*Bryopsida*) se řadí mezi zelené rostliny, u kterých nejsou plně vyvinuty cévní svazky (bezcévné rostliny). Jedná se o rostliny většinou malého vzrůstu (existují také druhy vysoké až 40 cm), jejichž hlavním rysem je výrazná schopnost zadržovat vodu. Stélka je rozlišena na lodyžku (kauloid), lístky (fyloidy) a přichytná vlákna (rhizoidy). (Pilous, 1960)

V životním cyklu rostlinky mechu převládá gametofyt nad sporofytem. Gametofyt je zelený a jedná se o haploidní stádium rostliny. Toto stádium je charakteristické tím, že každá tělní buňka obsahuje jen jednu sadu chromozomů. V této fázi je rostlina schopna fotosyntézy. Sporofyt již není zelený a závisí na gametofytu. Jedná se o diploidní stádium rostliny, kdy se v každé buňce nachází dvě sady chromozomů. (Pilous, 1960)



Obrázek č. 1.: Gametofyt a sporofyt (Pilous, 1960)

Formy a strategie týkající se mechu lze rozdělit na tři základní kategorie. Jedná se o růstové formy, životní formy a způsob větvení. V minulosti byly všechny kategorie charakterizovány a občas také spojovány. Například růstové a životní formy patřily pod jeden pojem. Dnes jsou rozdíly určeny jasně. Růstové formy se zabývají pouze jednotlivci, přičemž životní formy se zabývají celou populací. (GLIME, 2013)

Růstová forma mechu je definována jako (forma) lodyžka daného mechu, která má geneticky daný způsob větvení. Jedná se o konstantní znak. Naopak životní forma mechu je definována jako opakující se uspořádání fotosyntetických tkání. Ty omezují ztráty vody výpary, a naopak maximalizují primární produkci. U mnoha druhů odpovídá životním podmínkám. (GLIME, 2013)

2.2.1 Vodní režim

Díky nepřítomnosti vodivých pletiv patří většina mechy do ektohydrikové skupiny, kdy přijímají vodu celým povrchem těla. Voda je vedena vně, čemuž napomáhají papily, záhyby, zdrsnění a další struktury rostliny. Vnější transport je založen na kapilaritě. Lze uvažovat i transport mezi fyloidy, kdy se naskytují 4 možnosti. První je například pro *Pleurozium schreberi*, který má fyloidy hustě nahloučeny. Dále se jedná o transport mezi bází mezi fyloidy a kauloidem, což je typické pro mech *Timmia*. Velice efektivní je transport mezi rhizoidálním vlášením fyloidů nebo parafiliemi, což je typické například pro zástupce čeledě *Thuidiaceae*. A při posledním transportu rostlině napomáhají papily. V tomto případě se

jedná o transport na povrchu fyloidů. Největší množství vody mechy získávají z atmosférické vlhkosti. Především se jedná o mlhu, déšť, rosu nebo kondenzaci vzdušné vlhkosti. Vodní mechy absorbují velké množství vody ze svého okolí a zbylé množství pobírají ze substrátu. K úplnému nasycení vodou dochází během několika minut. (Váňa, 2006)

Některé druhy jsou po vysušení schopny obnovit metabolismus do několika málo hodin, kdy je obnovena dodávka vody. Existují také mechy, které přežívají vyschnutí mnoho měsíců až několik let. (Váňa, 2006)

2.2.2 Minerální výživa

Požadavky na minerální látky jsou shodné s požadavky cévnatých rostlin. Nejvýznamnější prvky pro růst mechů jsou K, Ca, Mg, N, P a S. Při jejich nedostatku dojde k omezení nebo potlačení růstu. Výjimečně obsahují i prvky jako niob či skandium, což je způsobeno tím, že mechy neobsahují systém kontroly přijímání prvků. (Váňa, 2006)

Minerální látky se do mechů dostávají převážně při dešti, díky nadrostu nebo prachu. Zachycené živiny se rozpouští ve vodě a poté jsou přijímány celým povrchem stélek přes buněčné stěny. Zde dochází k hlavní výměně prvků. Probíhá zde výměna kationtů a tvorba chelátů na buněčné stěně. Někdy mechy získají živiny tak, že absorbují vodu ze substrátu již obohacenou o potřebné živiny. (Váňa, 2006)

Množství prvků, které se uloží v rostlině, závisí na stáří gametofytů. Jednomocné ionty se ukládají přednostně v mladších částech, jako jsou vrcholové partie a dvoumocné ionty se ukládají ve starších částech rostliny. Draslík a sodík se vyskytují především v buněčných tekutinách, kdežto vápník se nachází mimo buňky a je důležitý pro zachování integrity buněčných stěn. Prvky jako jsou hořčík a zinek lze nalézt vně i uvnitř buněk. Dalším významným prvkem je dusík, který je důležitý pro růst rostlin, jeho rovněž transport probíhá ze starších částí do těch nových. (Váňa, 2006)

3 Nanočástice a jejich interakce v rostlinách

Zatím neexistuje jednotná definice pojmů nanomateriál a nanočástice. Nanomateriál bývá definován jako materiál, který má alespoň jeden vnější rozměr menší než 100 nm. Nanočásticí se rozumí malá část hmoty s definovanými hranicemi. Jedná se o částice, které mají strukturu o velikostech 1–100 nm. Nanomateriály mohou být přírodního původu nebo vytvořeny uměle. (2011/696/EU, 2011)

Nanomateriály přírodního původu jsou materiály produkované například sopečnou činností a zvětráváním hornin. Zdroj antropogenních nanomateriálů se liší podle toho, zdali jsou produkované záměrně či nikoli. U záměrně produkovaných nanomateriálů se může jednat například o nano-disperzní systémy. Původ nezáměrně produkovaných nanomateriálů je především dehet, dým, svařování, automobilová a letecká doprava. (Sanderson, 2014), (Goel, 2014), (Win-Shwe, 2011)

Nanomateriály můžeme rozdělit na dvě základní skupiny. A to na nanomateriály na bázi kovů (Au, Ag a další) a oxidů kovů (ZnO, CuO a další), a na nanomateriály na bázi uhlíku (fullereny a uhlíkaté nanotrubičky). (Cyrusová, 2015)

Experimentálně bylo zjištěno, že oba typy druhů nanočástic vytvářejí stres a generují přebytky těchto nanočástic v lipidech, bílkovinách, sacharidech a v DNA rostlin. (Liu, 2013)

3.1 Příjem a pohyb nanočástic rostlinou

Zdroje pro kontaminaci nanočásticemi mohou být půda, voda a atmosférické části prostředí. Je to dáno tím, že se všemi těmito složkami rostliny interagují. (Judy, 2010)

Nanočástice, které se vyskytují v atmosféře, se mohou shlukovat na povrchu rostliny, pronikat přes průduchy a ukládat se v listech rostliny. (Navarro, 2008), (Eichert, 2008) Dále mohou být rostliny kontaminovány nanočásticemi z půdy a sedimentů, kdy mohou interagovat s kořeny rostliny. (Zhu, 2008) Nanočástice se mohou pohybovat vně i uvnitř kořenového systému, dokud nedojde k průchodu nanočástice přes pokožku kořene a poté jdou do xylému, což je druh pletiva cévnatých rostlin, které přivádí a rozvádí živiny

z kořenové soustavy do nadzemních částí rostliny. V tomto případě se mohou jednotlivé nanočástice v rostlině přepravovat třemi způsoby. A to póry v buněčné stěně, apoplastem (transport mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou) a nakonec symplastem, který představuje vnitřní stranu plasmatické membrány, ve které se mohou volně šířit látky s nízkou molekulovou hmotností. (Miralles, 2012)

Obecně existují dva základní způsoby příjmu a přesunu nanočástic v systémech rostlin. Jedná se o systém kořeny – listy a systém listy – kořeny. V prvním případě jsou nanočástice absorbovány přes endodermis kořenové banky prostřednictvím apoplastických drah. Jedná se o pasivní cestu, kdy jde voda mezibuněčnými prostory díky vzniklému podtlaku do cévního válce a dále pokračuje do stonku rostliny a následně do listů a plodů. Ve druhém případě se jedná o průnik nanočástic přes průduchy nebo zachycení nanočástic v krycím pletivu (pokožce), distribuce do stonku, a nakonec do kořenů. (SIDDIQUI, 2015)

3.2 Hromadění v rostlinných tkáních

Ukládání nanočástic v rostlině podléhá jejich velikosti. Například ve studii distribuce nanočástic TiO_2 v pšenici se částice menší než 36 nm hromadily a šířily ve všech rostlinných tkáních. Naopak částice větší než 36 nm se především distribuovaly v kořenech rostliny pšenice a nedostaly se dále do stélky a výhonků rostliny. Studie ukázala, že toto hromadění nemá vliv na klíčení, růst, ani transpiraci a nevyvolává žádný oxidativní stres ani neovlivňuje fotosyntézu. (Judy, 2010)

Další studií, kterou se zabývala skupina několika vědců, byla studie zabývající se přenosem fullerenu C_{70} v okurce, které byly zkoumány pomocí radioaktivně značeného ^{141}Ce . Rostlina byla pěstována v prostředí nano- CeO_2 , kdy podle předpokladu vědců byl cer nalezen především v kořenech. Nakonec se také v menší míře vyskytoval na okrajích mladých listů. Tento experiment se odlišoval od jiných výzkumů tím, že byl použit Ce^{III} , jehož nanočástice se akumulovaly podél cév. (ZHANG, 2011)

Jedním z dalších příkladů je studie, kde byly nanočástice železa obalené uhlíkem o velikosti $46,5 \pm 1,7$ nm vstříkem aplikovány do tykve. Nejhojnější výskyt těchto nanočástic byl v okolí vstříku a poté v menší míře v kořenech a dalších částech rostliny. Následná

aplikace nanočástic způsobila, že se nanočástice objevily také v cytoplasmě epidermálních buněk, ale nedošlo k další migraci. Překvapivé bylo zjištění, že po namočení kořenů rostliny do suspenze složené ze stejných nanočástic, jaké byly použity pro vstřík, se nanočástice velmi rychle dostaly do mnoha dalších míst v rostlině. Za nejpravděpodobnější cestu přenosu nanočástic byl označen cévní systém řízený transpiračním proudem. (Du, 2016)

3.3 Nanočástice kovů

Rozmanité aplikace technologií (automobilový průmysl, letecký průmysl, továrny a další, viz kapitola č. 3.) mají mnohé vedlejší produkty ve formě nanočástic kovů a jejich oxidů. Proto dochází k jejich hromadění v životním prostředí, odkud se následně dostávají do rostlin. Nové studie ukazují, že nanočástice, které jsou přijímány a akumulovány v rostlinných tkáních způsobují negativní i pozitivní vliv. (SIDDIQUI, 2015)

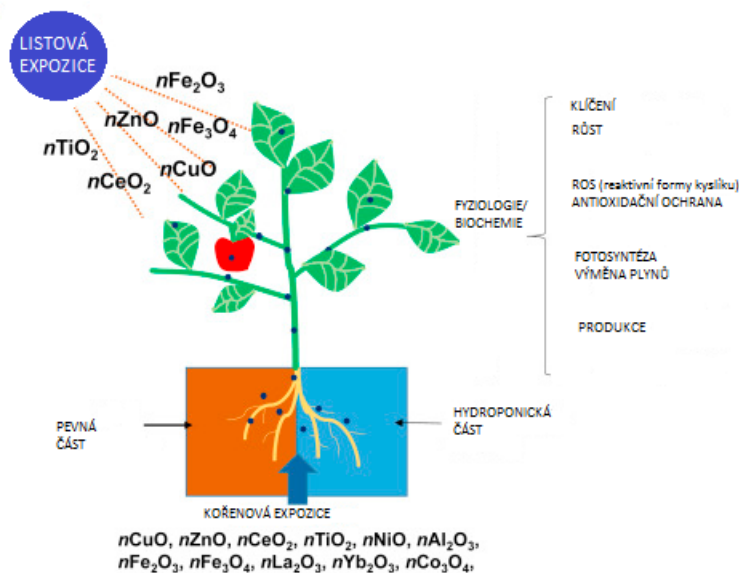
Rostliny jsou v přímém ohrožení působením měnících se klimatických podmínek, které jsou spojeny s různými typy abiotických stresů (viz dále). Jedná se zejména o kontaminaci těžkými kovy, které omezují růst rostlin. Ty jsou přijímány spolu s podstatnými prvky z půdy, kdy si již rostliny vyvinuly rozličné strategie, jak se vyrovnat s akumulací kovů. (Mustafa, 2016)

3.3.1 Nanočástice oxidů kovů

Nanočástice mohou přijít do styku s jinými znečišťujícími látkami, včetně jiných nanočástic v mnoha prostředích zejména biomasy. Interakce, různých typů se mohou objevit ve směsích nanočástic oxidů kovů (např.: heteroagregace, absorpce kovových iontů). Mohou se vyskytnout v důsledku specifických vlastností nanočástic oxidů kovů (s velkým specifickým povrchem, diferenční rozpustností). Interakce s jinými nanočásticemi může, podle pořadí, mít vliv i na jejich toxicitu. (Joško, 2016)

Doposud bylo provedeno několik studií zaměřených na sledování stresu u rostlin po expozici nanočásticím. Jednalo se o vyhodnocení interakce nanočástic s jinými znečišťujícími látkami, včetně těžkých kovových iontů a jejich vlivu na toxicitu, jakož i vychytávání iontů těžkých kovů organismy nebo rostlinami. (Joško, 2016)

Hlavní fotosyntetický pigment v rostlině je chlorofyl a, který je náchylnější k fotodegradaci než jiné pigmenty. Chlorofyl a je užitečný indikátor toxicity nanočástic v rostlině. (Rico, 2013)



Obrázek č. 2.: Schématický diagram fyziologických a biochemických efektů působení nanočástic oxidů kovů na rostlinu (Du, 2016)

Jako příklad lze uvést analýzu nanočástic CeO_2 v rostlině rýže, kdy tyto nanočástice nevykazovaly žádnou toxicitu, ale snížilo se množství chlorofylu v rostlině. (Rico, 2013) Dále například pokus se sazenicemi slunečnice, kdy byly použity nanočástice Fe_3O_4 a CoFe_2O_4 , jejich toxicita se projevila ve větší míře u Fe_3O_4 , kdy úbytek chlorofylu byl 50 %, a v menší míře u CoFe_2O_4 , kdy byl úbytek pouze 28 %. (Ursache-Oprisan, 2011) Související studie, kdy byly zelené řasy (*Scenedesmus obliquus*) vystaveny nanočásticím SiO_2 a koncentraci 50 mg/l, vykazovala značné snížení množství chlorofylu navzdory normálnímu růstu. (Wei, 2010)

Poměr chlorofylu a/b je globálním indikátorem fotosyntetické aktivity v rostlinách, jako odezva na světlo. (Hikosaka, 1996)

Studie chlorofylové fluorescence vystavené nanočásticím CuO ukázala, že nanočástice výrazně snížily kvantový výtěžek, který je ukazatelem zpomalení růstu rostlin. Celkové výsledky ukázaly, že nanočástice CuO snížily přeměnu světelné energie absorbované přes elektronový transport. Což je důsledkem toho, že nanočástice CuO narušily mitochondrie,

dilataci chloroplastové membrány a střídání fotosyntetických pigmentů. (Lalau, 2014), (Saison, 2009)

Nano-anatas zlepšil aktivitu fotosyntézy v rostlinách díky velkému specifickému povrchu, vysoké tepelné vodivosti a vysoké fotokatalytické schopnosti. (Mingyu, 2007)

Expozice nanočásticím TiO₂ na rostlinách špenátu a rajčat má za následek zvýšenou absorpci světla chlorofylem. (Mingyu, 2007)

3.3.2 Nanočástice ZnO

ZnO ve formě nanočástic má výborné antibakteriální účinky, vynikající fyzikální a chemickou stabilitu, biokompatibilitu. Dále vykazuje specifické optické, akustické, magnetické, piezoelektrické nebo elektrické vlastnosti. Další významnou vlastností ZnO je schopnost fotokatalytických reakcí. (Kvasničková, 2008)

To, jakou strukturu a vlastnosti budou mít nanočástice ZnO je ovlivněno tím, jakou metodou budou připraveny. Je zde mnoho faktorů, které ovlivňují přípravu nanočástic. Je to pH, teplota, tlak, stabilizátory, druh materiálu, rozpouštědlo, poměr výchozích složek, prostředí, manipulace se vzorky, redukční činidla a použité chemikálie. (Sedlák, 2010)

Negativní efekty u ZnO byly prokázány od sub-buněčné úrovně (aktivita enzymů) až po úroveň populační (reprodukce). Studie provedené doposud v této oblasti prokazují poškození RNA, oxidativní stres, zpomalení růstu organismů, snížení reprodukce a kumulace nanočástic v organismu. (Masař, 2013)

4 Stres v rostlinách

Rostliny během života zažijí působení řady stresových faktorů. Tyto stresové faktory mohou zpomalovat jejich životní funkce, poškozovat orgány nebo vést až k uhynutí rostliny. Stresové faktory se rozdělují na dva typy. Prvním z nich jsou biotické faktory, kdy se jedná o útok patogenu, stárnutí nebo negativní působení okolních organismů. Dále to jsou abiotické faktory, což jsou světlo, teplo, mráz, chlad, sucho apod. (Piterková, 2005)

Reakci rostliny na stres lze rozdělit do následujících skupin. Poplachová reakce, kdy rostlina nejprve zjistí přítomnost stresoru. Restituční reakce, kdy dochází k aktivaci obranných mechanismů. Dále rezistenční reakce, kdy rostlina pomocí obranných mechanismů přežívá. A nakonec dochází buď k přežití nebo k smrti organismu. (Vacca, 2004)

4.1 Oxidativní stres

U rostlin může být vyvolán oxidativní stres působením stresových faktorů. Ten je charakteristický prudkou, ale přechodnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS). (Scandalios, 1990), (Mittler, 2002)

Zdrojem takových to ROS jsou redoxní reakce. Příkladem je redukce kyslíku v průběhu elektronového transportu v mitochondriích. (Vranova, 2002)

Vznik singletového kyslíku zapříčiňuje vznik dalších aktivních forem jako jsou peroxid vodíku, hydroxylové radikály a další. Tyto reaktivní molekuly působí ničivě na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. (Vranova, 2002)

Ochranu před oxidačním poškozením tvoří řada antioxidačních obranných systémů v buněčných strukturách. Jsou to například β -karoten, glutathion, α -tokoferol, enzymy a další. (Chen, 2004)

4.1.1 Mechanismy odolnosti rostlin

Nestálé podmínky okolního prostředí nepříznivě působí na rostliny. Ty jsou pod vlivem stresorů a vyskytují se ve stresu. Studium tohoto typu je zaměřeno na přenos podnětů vyvolávajících stres na rozhraní orgánů rostliny s okolním prostředím a dále na přenos signálů uvnitř rostliny. (Procházka, 1998)

Mechanismy odolnosti rostlin vůči stresu jsou dvojího typu. Jedná se o mechanismy zabraňující tomu, aby rostlina byla jakémukoli stresu vystavena. Je to proces s pasivním a dlouhodobým charakterem, který zahrnuje mechanickou bariéru rostlin. Například řada

organických látek, výrazná impregnace buněčných stěn apod. Druhým typem je aktivní obrana rostlin, která snižuje negativní dopad stresových faktorů přímo v rostlině. Zde dochází ke spuštění řetězce změn, tedy stresových reakcí. (Neill, 2002)

Proces a konečný efekt stresové reakce závisí na síle, délce působení i na rostlině samotné, kdy především záleží na stádiu vývoje rostliny, vitalitě a adaptační schopnosti. Často bývá působení stresových faktorů omezeno pouze na část rostliny, kde dochází k lokální stresové reakci. (Piterková, 2005)

4.1.2 *Reaktivní formy kyslíku (ROS)*

ROS zahrnují volné radikály i látky, které volnými radikály nejsou. Proto je nepřesné, avšak používané označení kyslíkové radikály. Volným radikálem je jakákoliv chemická molekula, atom nebo ion, která má ve vnější sféře svého elektronového obalu alespoň jeden nespárovaný elektron a je schopna samostatné existence. Pro ROS se jedná o volné radikály vytvořené z molekul kyslíku obsahující nepárový elektron a sloučeniny kyslíku, které nejsou volnými radikály. Ovšem z takovýchto sloučenin, které nemají charakter radikálů mohou radikály vznikat. (Tripathi, 2016)

Volnými radikály jsou singletový kyslík, superoxidový anion-radikál, hydroxylový radikál, hydroxylový ion, perhydroxylový radikál, peroxid vodíku. (Tripathi, 2016)

4.1.3 *Umístění produkce reaktivních forem kyslíku v rostlině*

V rostlinách je mnoho známých zdrojů ROS, které jsou vytvářeny v průběhu normálního metabolismu například průběh fotosyntézy. (Piterková, 2005)

Nejvýznamnějším zdrojem ROS jsou v rostlinách chloroplasty. Množství ROS se zvyšuje pomocí světla. Další zdroje ROS jsou mitochondrie, peroxisomy, endoplazmatické retikulum, membrána, buněčná stěna a apoplast. (Piterková, 2005)

4.1.4 Katabolismus reaktivních forem kyslíku

Pro odstranění ROS si rostliny vyvinuly obranné systémy. Tyto obranné systémy chrání buňky proti oxidativnímu poškození. (Vranova, 2002), (Inzé, 1995)

Ochranné mechanismy se dělí na neenzymové systémy, které slouží k přímé deaktivaci. Jedná se o kyselinu askorbovou, α -tokoferol, karotenoidy. A dále to jsou enzymy a enzymové systémy. Ty jsou všeobecně používány na ochranu proti ROS. Jedná se o enzym kataláza, superoxid dismutáza, dále o enzymy askorbát-glutathionového cyklu a glutathion peroxidáza. (Dat, 2002)

4.2 Stres v rostlinách vyvolaný nanočásticemi

Nadbytek nanomateriálů ohrožuje nejen ekosystém ale i zdraví lidské populace. Nanotoxikologie je obor zabývající se riziky a vedlejšími nebo nežádoucími účinky nanočástic. Jedná se o studium účinků nanočástic a jejich vzájemné působení s rostlinami. (Tripathi, 2016)

Většina nanočástic, při určitých koncentracích, způsobují toxicitu, která ovlivňuje produktivitu rostlin. Je to důsledkem změny morfo-anatomické, biochemické, fyziologické a genetické konstrukce. (Tripathi, 2016)

Rostliny pohlcují a následně akumulují nanočástice o různých velikostech. Ty se v systému hromadí v nadzemních částech. Po akumulaci se začne snižovat kvalita plodin, zejména v oblasti klíčení semen, délce kořenů a výhonků. To způsobí změnu procesu fotosyntézy, zvýšení poškození RNA. Avšak rostliny mají obranné mechanismy pro překonání toxicity způsobené stresory. Může se však stát, že toxicita nanočástic je příliš vysoká a obranný mechanismus ji nepřekoná. Poté dojde k aktivitě apoptózy (programované buněčné smrti) v rostlinách. (Tripathi, 2016)

Díky dopravě, chování a bioakumulaci jednotlivých nanočástic je důležité je zkoumat i ve formě agregátů (shluků). (Tripathi, 2016)

4.2.1 *Toxicita nanočástic pro rostlinu*

Doposud provedené studie, které byly zaměřeny na toxicitu rostlin zkoumaly pouze účinek nanočástic na klíčivost a hromadění rostlinné biomasy. Časté příznaky toxicity způsobené nanočásticemi jsou ucpávání pórů a bariér v apoplastickém proudu, což vede ke snížení příjmu živin. (Tripathi, 2016)

Po vzájemném působení nanočástic s rostlinou vznikají morfologické a anatomické změny v závislosti na koncentraci a chování nanočástic. Vliv nanočástic je různorodý v závislosti na jejich velikosti, chemické struktuře, reaktivitě, povrchových úpravách apod. Jsou prokázány jak pozitivní, tak i fyto toxické účinky nanočástic v rostlinách. Nejlepší parametry pro posouzení fyto toxicity jsou právě změny v oblasti listových ploch, akumulaci biomasy nebo zpomalení růstového potenciálu. (Tripathi, 2016)

Dále mohou nanočástice omezit nebo narušit celkový růst a vývoj, jelikož ovlivňují jednak kvetení a stárnutí, tak i rozmnožování. V takovéto souvislosti nanočástice mohou mít vliv na peroxidaci lipidů pomocí generování ROS. Mohou podstatně ovlivnit propustnost membrány a tím i příjem živin. Dále se vyskytuje omezení v rychlosti transpirace a úbytek množství chlorofylu v rostlinách. (Tripathi, 2016)

Pro přežití rostliny je velice důležitý kyslík, který se využívá pro výrobu energie. ROS se vytváří prostřednictvím mechanismu pro přenos energie kyslíku nebo z reakcí přenosu elektronů. V závislosti na typu ROS jsou vykazovány různé typy činností v buněčných organelách rostlinných buněk. Právě díky ROS může být definováno toxické působení v rostlinách vlivem oxidů těžkých kovů nebo dále i snížení produkce fotosyntézy. (Tripathi, 2016)

Expozice rostlin kovovým nanočásticím představují důkaz buněčné produkce ROS. Vygenerované radikály figurují jako signální molekuly a tím se aktivuje rostlinný antioxidant (obránný mechanismus). Dosavadní studie ukazují přímý vliv nanočástic, avšak zatím není prokázána souvislost s chemickými vlastnostmi nanočástic. Jednotlivé studie ukazují pouze nerovnoměrné a nevyrovnané účinky nanočástic na aktivitách obranných mechanismů. Předěšlé studie uvádí, že expozice spolu a druhem, vlastnostmi a koncentrací

nanočástic jsou hlavními faktory, které ovlivňují reakci systému antioxidační obrany v rostlinách. (Tripathi, 2016)

5 Kyselina askorbová

Tato kyselina tvoří bezbarvé a ve vodě rozpustné krystaly. Je nestálá, její rozklad je rychlý. Řadí se mezi reverzibilní oxidačně-redukční systémy. (Hampl, 2002)

Kyselina askorbová (AsA) se vyskytuje obecně ve dvou izomerech. Jedná se o levotočivou formu a o pravotočivou formu. Je to jeden z hlavních metabolitů v rostlinách, jakožto antioxidantu, který s dalšími složkami chrání rostliny proti poškození ROS. Ovšem kromě této funkce se AsA značnou mírou podílí i na kontrole buněčné stěny, buněčném dělení, redukci iontů, regeneraci, absorpci apod. (Zhang, 2007)

Rostliny pro své metabolické procesy získávají energii ze slunečního záření a uhlík získávají z oxidu uhličitého. Další významnou schopností rostlin je dovednost syntetizovat AsA. Ovšem díky dnešním možnostem vědy a výzkumu lze zvyšovat množství AsA v rostlinách pomocí genetického inženýrství. (Zhang, 2007)

AsA se řadí k hlavním antioxidantům a jejími dalšími funkcemi v rostlinách jsou regulace fotosyntézy, svou roli má i při fotoprotekci nebo dále jako sekundární antioxidant. (Zhang, 2007)

V rostlinách se biochemické funkce AsA dělí na 4 typy. Zastupuje tedy funkce antioxidantu, kdy reaguje s kyslíkem, ozónem a peroxidem vodíku a podílí se na odstraňování těchto reaktivních forem. Dále se vyznačuje funkcí enzymového kofaktoru, kdy hraje důležitou roli při růstu buněk. Další funkcí AsA je elektronový transport, kdy v rostlině může působit jako elektronový donor nebo jako obojí, ve smyslu, že zastupuje jak elektronový donor, tak i elektronový akceptor. (Smirnoff, 1996)

5.1 Syntéza kyseliny askorbové

Doposud není zcela objasněna. Ovšem pravděpodobné cesty v této oblasti již existují. Za uznávané a obecně platné jsou považovány výsledky Smirnova. (Smirnov, 1996)

V rostlinách probíhá biosyntéza AsA v mitochondriích a odtud se následně dostává do dalších buněčných komponent pomocí difuze, případně pomocí elektrochemického gradientu. Zatím byly navrženy pouze dvě cesty, které jsou považovány za pravděpodobné. Jedná se o biosyntetickou cestu s využitím L-galaktón-1,4-laktonu a o biosyntetickou cestu přes D-glukosán, L-sorboson. (Smirnov, 1996)

5.2 Výskyt a lokalizace

AsA se vyskytuje ve fotosyntetizujících eukaryotech zahrnujících řasy a mechorosty. Výskyt AsA v rostlinách je velmi různorodý. Vyskytuje se v chloroplastech, kde je její výskyt spojován s její rolí při fotosyntéze. Dále pak v buněčné stěně, kdy u některých rostlin, je na plazmatické membráně vysoká afinita přenašečů této kyseliny. Ovšem vyskytuje se také i v cytoplazmě, vakuolách nebo v mitochondriích. (Shao, b.r.)

5.3 Funkce v rostlinách

AsA má v rostlinách různorodou škálu funkcí. Mezi nejlépe objasněnou patří její role při enzymatických reakcích. Další významnější funkcí je účast AsA při buněčném dělení, kdy tento děj stimuluje. (Smirnov, 2005)

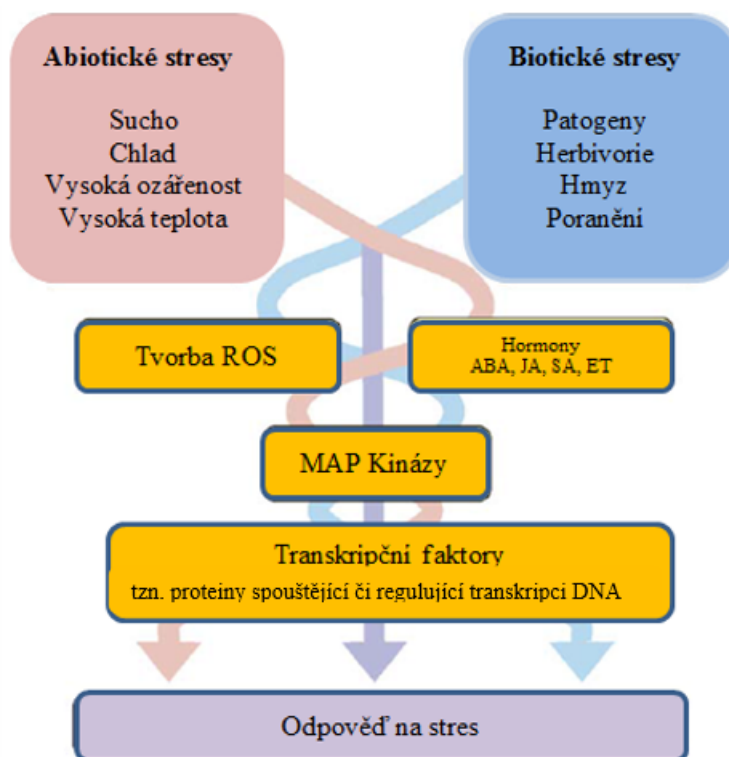
Vědecké studie prokázaly mnoho dalších funkcí AsA v jednotlivých rostlinách, které byly zkoumány. Jsou to kontrola růstu a roztažnosti buněčné stěny, vliv na růst rostliny a ochrana před ozónem, stabilita genomu a syntéza hormonů, úloha při absorpci NO₂, funkce prooxidantu. (Smirnov, 2005)

5.4 Kyselina askorbová a reaktivní formy kyslíku

AsA v rostlinách vstupuje do chemické reakce s radikály kyslíku a jeho deriváty. Ty se v rostlinách vyskytují právě v chloroplastech a mitochondriích, kdy se jedná o vedlejší produkt buněčného metabolismu. Množství ROS se zvyšuje v důsledku stresových faktorů působících na rostlinu. (Davey, 2000)

5.5 Kyselina askorbová a reakce na stresové situace

Akumulace ROS v rostlině je jednou z nejrychlejších odpovědí organismu na vliv stresorů. Důsledkem stresových podmínek se rostlina postupem času dokáže aklimatizovat na toto prostředí nebo naopak dojde k jejímu zániku. Obě možnosti jsou středem zájmu studií, zabývajících se touto problematikou. Kdy se klade důraz na to, že v životním prostředí na rostlinu působí několik stresorů zároveň, kdežto v laboratorních podmínkách sami určujeme, jakým podmínkám bude rostlina vystavena. Toto se poté odrazí ve výsledcích. (Shao, b.r.)



Obrázek č. 3.: Stresové faktory (Fujita, 2006)

Stresorů působících na rostlinu je mnoho, jedním z nich je odezva na teplotu, tedy teplotní stres. Bylo zjištěno, že každá rostlina na tento typ stresoru reaguje jinak v závislosti na fyziologických předpokladech. Ukázalo se, že vyšší teploty škodí mnohem více a ve větším množství vzniká ke vzniku ROS nežli u teplot nižších. K této oblasti samozřejmě patří i případný vliv takzvané nestresující teploty. (Guo, 2006) Předpokladem je, že by tato teplota, která se pohybuje v rozmezí 25 až 30 °C, nevykazuje žádný, případně minimální stres. Ovšem studie ukázaly, že tato teplota způsobuje 60–80 % navýšení kyseliny dehydroaskorbové, tedy dochází k negativnímu ovlivnění rostliny. Toto následně, v závislosti na druhu rostliny může vést k řetězové reakci až k nadměrné produkci ROS. (Paolacci, 1997)

Dalším významným stresorem je světlo. V této oblasti sice nebylo doposud provedeno mnoho výzkumů týkajících se rostlin, ale z těch provedených víme, že při nízkém osvětlení (50 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a při naopak vysoce intenzivním osvětlení (250 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zkoumané rostliny jevíly normální známky růstu. V tmavším prostředí bylo množství AsA nižší než u rostlin ozářených intenzivním světlem. Ke stejnému závěru došlo zatím několik málo vědeckých týmů. (Bartoli, 2006)

Na druhou stranu, rostliny vystaveny dehydrataci nebo naopak hydrataci patří do velmi specifické skupiny. Zde je stresorem vodní stres, kdy zatím nebylo docíleno shodného výsledku. Jedná se o neshodu množství AsA v rostlině po vystavení stresoru, pravděpodobně je to důsledkem použití různých druhů. Každá rostlina reaguje na tento stresor specificky a v jiné míře, kdy jedné rostlině vadí voda a druhé neprospívá sucho. (Augusti, 2001)

Zvýšené množství ozónu je význačné v rostlině tím, že dochází k zvýšení hydroxylových a superoxidových radikálů a dále i peroxidu vodíku. Tyto změny nejdříve nastávají v apoplastu a poté i v symplastu buněk rostlin. Tímto dojde k radikálnímu úbytku AsA v rostlině, která se spotřebuje na takzvanou opravu škod. (Robinson, 2000)

Jedním z důležitých poznatků v oblasti kyseliny askorbové spojované se stresovými reakcemi v rostlinách je i stres způsobený znečištěním rostlin prachem. Je to spojováno především s obsahem AsA v listech rostlin. Jedná se o jakési zhodnocení schopnosti rostlin zachycovat nebo nezachycovat prachové částice na svůj povrch, kdy předmětem zkoumání

je právě vliv přítomnosti nebo naopak nepřítomnosti těchto částic na funkce rostliny. Bylo prokázáno, že se zvýšeným množstvím uložení prachu na povrchu rostliny se i zvýšilo množství AsA. V tomto případě se jedná o významný objev, kdy se jedná o pozitivní vztah mezi AsA a stresem. Díky těmto zjištěním, by se daly některé druhy rostlin využít k cílenému zachytu prachových částic z životního prostředí, které jsou pro člověka škodlivé. (Prajapati, 2008)

Jedním z posledních důležitých stresorů u rostlin je stres způsobený zasolením. Jedná se o abiotický stresor, kdy jeho působením dochází k vzniku ROS. V tomto případě je množství AsA v rostlině velmi nízké, tedy rostlina vykazuje velké poškození v důsledku působení tohoto stresoru. Ovšem permanentním působením chloridu sodného na rostliny poukazuje na skutečnost, že AsA snižuje nepříznivé účinky tohoto stresoru a tím pomalu zvyšuje toleranci vůči němu. Toto by mohlo tvořit problém v některých oblastech planety, kde v takovýchto podmínkách pěstují rostliny určené ke konzumaci. (Dolatabadian, 2008)

6 Titrační metoda

Většinou je AsA kvantifikována pomocí titračních nebo chromatografických metod. Pro experimenty spočívající ve stanovení míry stresu po expozici nanočásticím oxidů kovů lze využít obě metody. Avšak v této práci bude věnována pozornost pouze první metodě. (Karlíček, 2001)

Titrační stanovení neznámé koncentrace AsA ve známém objemu titru, je založeno na změření objemu titračního standardu (jehož koncentraci známe), jenž jsme spotřebovali pro úplnou reakci (aby jednotlivé látky zreagovaly beze zbytku – tzv. bod ekvivalence). (Karlíček, 2001)

Obvykle se titrace s použitím titračního standardu provádí 3 – 4krát, kdy je první měření pouze orientační. Poté se přechází k titraci jednotlivých vzorků. (Karlíček, 2001)

Principem je přesné měření objemu titračního činidla, které je postupně dávkováno z byrety k známému objemu analyzovaného roztoku, až do okamžiku, kdy mezi nimi proběhne kvantitativní chemická reakce – bod ekvivalence. Kdy ze spotřebovaného

množství titračního činidla a jeho koncentrace spolu se znalostí objemu analyzovaného roztoku se dopočte množství analyzované látky. (Kraml, 1999)

Titrace se dělí na přímou, nepřímou a zpětnou, kdy pro stanovení AsA je nejvhodnější přímá titrace. (Karlíček, 2001)

B. PRAKTICKÁ ČÁST

1 Metodika

1.1 Rostlinný materiál

Pro tento experiment byl vybrán mech *Pleurozium schreberi*, jenž je běžně využíván pro biomonitoring. V České republice se vyskytuje velice čteně ve všech oblastech.

Pro tento výzkum byla vybrána oblast Starých Hamer, která se vyskytuje v CHKO Beskydy. Tato oblast je považována za nejčistší z okolí. Výběr oblasti byl ovlivněn i několika dalšími faktory. Byly to zejména vzdálenost zdrojů znečištění a komunikačních sítí.

Odběr vzorků byl proveden v blízkosti potoka Červíku začátkem října 2016. Z důvodu standardizace, byly odebírány pouze zelené, vrcholové části lodyžek, což činilo přibližně 2-4 cm rostlinky. (Boquete, 2013) Použitím právě této části mechu byla zajištěna nejnižší možná koncentrace škodlivých látek přijatých z prostředí. Z důvodu zajištění sběru s minimalizací jakékoli kontaminace byly pro sběr mechu použity rukavice. Části mechu byly uloženy v plastových pytlech a skladovány v lednici, až do doby další manipulace. Bylo to z důvodu zajištění toho, aby se nespustila případná stresová reakce změnou prostředí. V souvislosti se všemi provedenými ochrannými prvky pro eliminaci zkreslení lze považovat vzorky za reprezentativní.



Obrázek č. 4.: Vzorky po převozu do laboratorních podmínek

V laboratorních podmínkách bylo odebrané množství mechu rozděleno na 2 sekce. Jedna se rozdělila na dílčí vzorky, kdy polovina byla uložena do Petriho misek a druhá část byla uložena na filtrační papír. Druhá sekce byla očištěna a omyta studenou vodou. Následně byla polovina uložena na savý filtrační papír k proschnutí při laboratorní teplotě a druhá polovina byla předána do Petriho misek. Celkem bylo připraveno 72 dílčích vzorků ve 4 sekcích.



Obrázek č. 5.: Dělení vzorků podle experimentálních podmínek

Následující 3 týdny byla prováděna předpříprava vzorků, která spočívala ve vlhčení a sušení jednotlivých vzorků (viz tabulka č. 1.). Výsledky byly statisticky a graficky zpracovány v programu R. (R CORE TEAM, 2016)

Tabulka č. 1.: Rozdělení vzorků pro experiment

vzorky umyty	+ sušeny
vzorky umyty	+ vlhčeny (destilovaná voda)
vzorky nemyty	+ sušeny
vzorky nemyty	+ vlhčeny (destilovaná voda)

2 Expozice mechu

2.1 Příprava suspenze

Suspenze pro expozici nanočásticím oxidů kovů musela splňovat určité požadavky. Všechny nanočástice musely být suspendovány a nesměly agregovat ani sedimentovat po

celou dobu manipulace. Tyto vlastnosti byly zajištěny přípravou suspenze ultrazvukem, kdy byly nanočástice ZnO spolu s destilovanou vodou v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.

2.2 Expozice nanočásticím ZnO

Původní skupiny vzorků mechu byly všechny přeloženy do Petriho misek a rozděleny pro experiment následovně, viz tabulka číslo 2.

Tabulka č. 2.: Rozdělení vzorků

umyté vzorky	+ sušeno	+ destilovaná voda
		+ suspenze ZnO
umyté vzorky	+ vlhčeno (destilovaná voda)	+ destilovaná voda
		+ suspenze ZnO
nemyté vzorky	+ sušeno	+ destilovaná voda
		+ suspenze ZnO
nemyté vzorky	+ vlhčeno (destilovaná voda)	+ destilovaná voda
		+ suspenze ZnO

Vzniklo tedy konečných 8 sekcí, kdy každá obsahovala 9 vzorků. Všechny jednotlivé vzorky byly po dobu 5 týdnů vystaveny stresovým podmínkám. Tyto podmínky se lišily, viz dělení vzorků.

Expozice byla prováděna 2x týdně v rozestupu 3 a 4 dnů. Do každé Petriho misky bylo aplikováno 2,5 ml destilované vody/suspenze ZnO.



Obrázek č. 6.: Aplikace suspenze ZnO

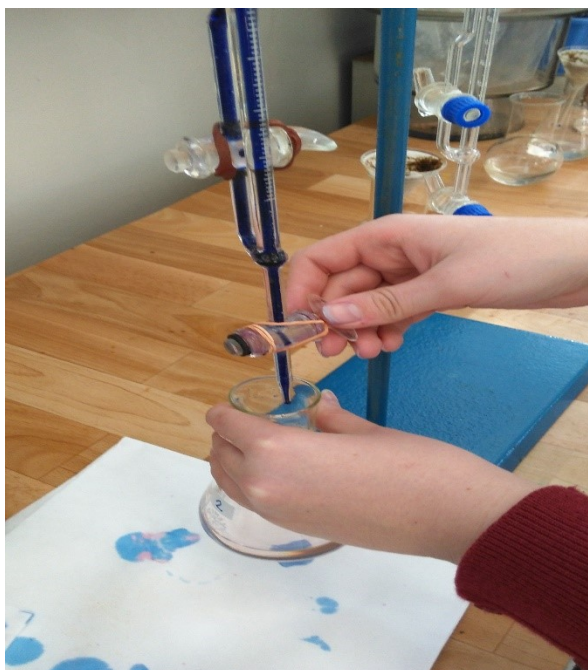
2.3 Analýza vzorků

Analýza jednotlivých vzorků byla provedena pomocí titrační metody. Ke každému vzorku se nejprve přidalo 100 ml 2 % kyseliny metafosforečné a poté se vložily na 30 minut do třepačky. Poté se nechaly vzorky přefiltrovat, aby došlo k odstranění pevné části vzorku (mechu), aby se dále nedocházelo k výluhu.



Obrázek č. 7.: Filtrace vzorků

Následovala samotná titrace. Nejprve byla provedena titrace s použitím titračního standardu (roztok AsA o známé koncentraci), titračním činidlem 2,6-dichlorfenolindofenolem, za účelem zjištění orientačního bodu ekvivalence. Dále byly jednotlivé, přefiltrované vzorky postupně titrovány 2,6-dichlorfenolindofenolem až do růžového zbarvení (bodu ekvivalence).



Obrázek č. 8.: Filtrace

potřeba titračního činidla odpovídala koncentraci AsA, která se v rostlinách spotřebovala na opravu enzymů, membrán apod. poškozených oxidativním stresem.

3 Výsledky

Cílem práce bylo stanovení míry fyziologického stresu v buňkách známého biomonitoru *Pleurozium schreberi*, jenž se řadí k mechorostům. Dále stanovení stresu po expozici suspenzi nanočástic ZnO a následné srovnání se vzorky neexponovanými, kdy indikátor stresu byl obsah kyseliny askorbové ve stélce mechu.

Indikátor stresu byl experimentálně stanoven pomocí interakce AsA s 2,6-dichlorfenolindofenolem titrační metodou. Srovnání a stanovení množství AsA proběhlo po pětítýdenní expozici.

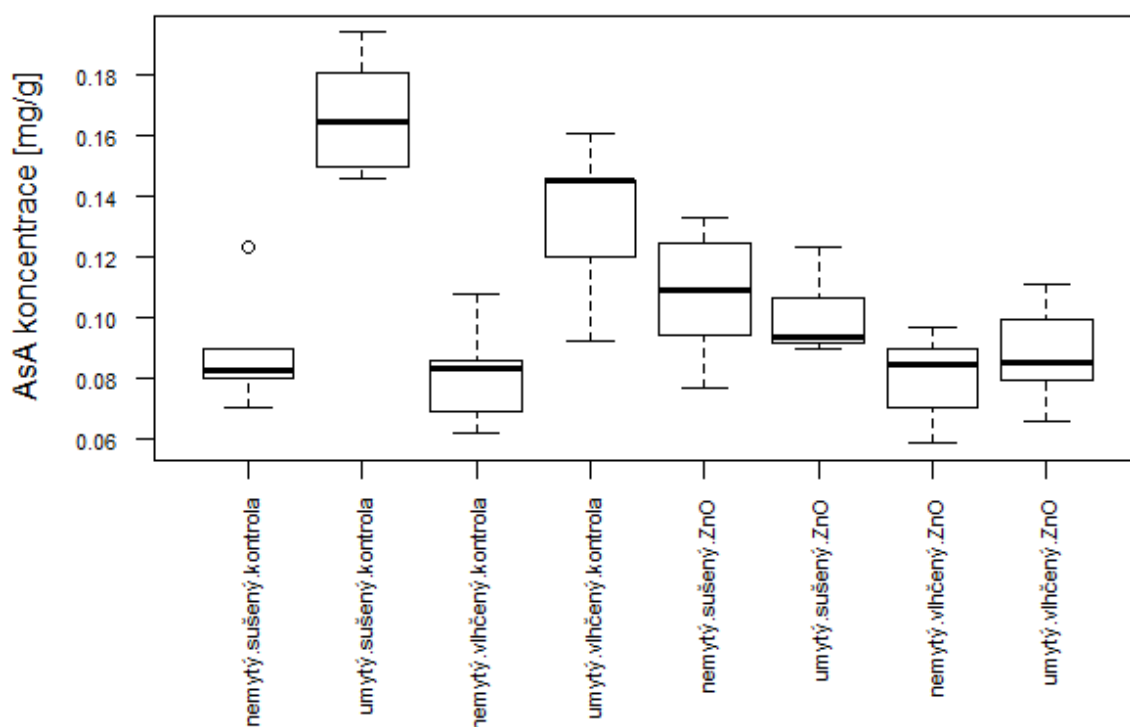
Graf 1 představuje naměřený obsah AsA v jednotlivých skupinách vzorků. Mimo jiné tedy znázorňuje srovnání vzorků neexponovaných s exponovanými.

Nejvyšší obsah AsA byl detekován ve skupině vzorků, které byly umyté, sušené a neexponované. Zde dosahovala průměrná koncentrace AsA hodnoty 0,165 mg/g. To znamená, že tyto rostliny nezažívaly velké množství stresu, jelikož bylo spotřebováno jen malé množství AsA na opravu organismu v důsledku vyvolaného stresu stresorem. O několik málo jednotek méně měla poté skupina vzorků, které byly umyté, vlhčené a neexponované. Jejich koncentrace AsA dosahovala hodnoty 0,145 mg/g. Z toho vyplývá, že zde byla reakce na stresor ve větší míře nežli v předchozím případě. Vzorky, které patří do skupiny neumytých, sušených a neexponovaných se průměrnou hodnotou AsA téměř shodovaly se skupinou vzorků, které byly neumyté, průběžně vlhčené a neexponované. Hodnota koncentrace AsA dosahovala kolem 0,085 mg/g. Z této nízké koncentrace lze usoudit, že vyvolaný stres byl značný. Na opravu škod způsobených stresem v obou zmíněných skupinách bylo zapotřebí velké množství AsA. Ovšem tato vysoká míra stresu mohla být podpořena i předpřípravou vzorků, kdy ani jedna se skupin nebyla podrobena mytí. Je tedy možné, že na nemytých vzorcích mechorostu zůstaly částice prachu a jiných cizorodých látek, které bránily fotosyntéze.

Ve skupinách vzorků, které byly exponovány nanočásticím ZnO lze vidět, že míra vyvolaného stresu byla vysoká. Největší průměrnou koncentraci AsA vykazovala skupina vzorků, které byly neumyté, sušené a exponované. Tato koncentrace AsA dosahovala hodnoty 0,11 mg/g. Menší množství AsA (0,09 mg/g) bylo naměřeno ve vzorcích ze skupiny umytých, sušených a exponovaných mechů. Poslední dvě skupiny obsahovaly průměrnou koncentraci AsA v podobné míře. Skupina vzorků, které byly neumyté, vlhčené a exponované spolu se skupinou vzorků, které byly umyté, vlhčené a exponované dosahovaly průměrné hodnoty AsA kolem 0,08 mg/g.

Při porovnání skupin vzorků, které byly neumyté, vlhčené nebo sušené a exponované či nikoli, se průměrné hodnoty koncentrace AsA příliš nelišily a v obou případech byly velmi nízké. Na druhou stranu skupiny vzorků, které byly umyté, vlhčené nebo sušené a exponované či nikoli se od sebe značně lišily, v závislosti na skutečnosti, zda byly jednotlivé vzorky exponované nebo nebyly. Ty neexponované disponovaly vyššími hodnotami AsA nežli ty exponované. Z toho vyplývá, že expozice nanočásticím ZnO ve značné míře vedly k poškození rostlin, použitých pro experiment.

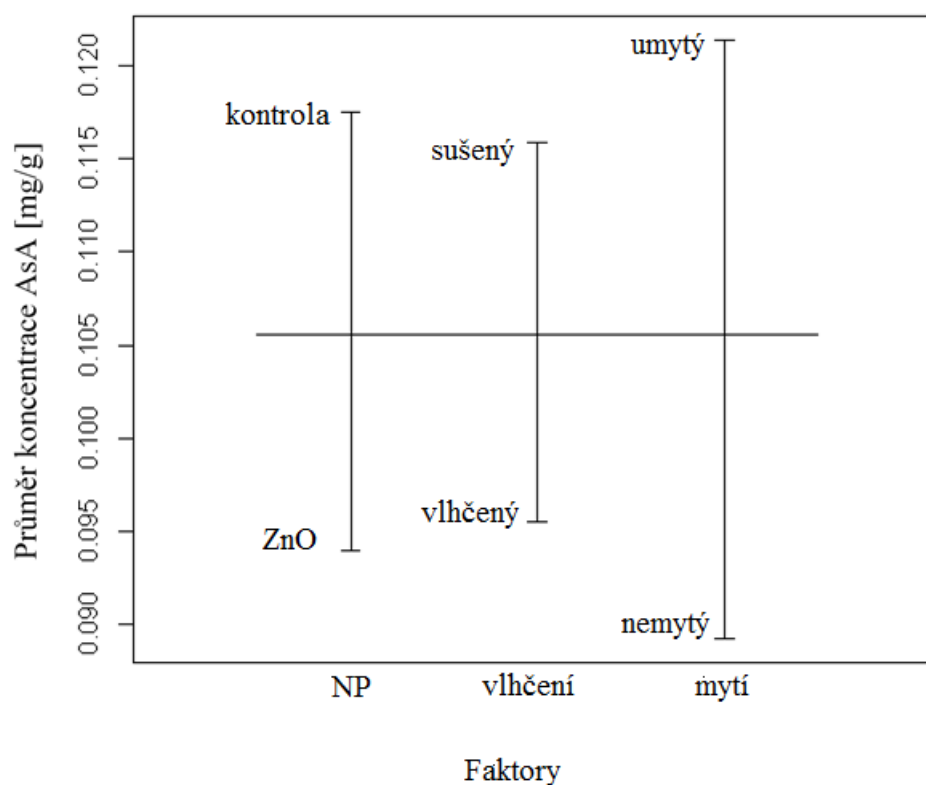
Nejnižší průměrné hodnoty koncentrace AsA (kolem 0,08 mg/g), které jsou patrné ve spodních částech grafu, vykazovaly skupiny vzorků nemytých, vlhčených, neexponovaných; nemytých, sušených, neexponovaných spolu se skupinami vzorků, které byly nemyté, vlhčené, exponované; myté, vlhčené a exponované. Zde byla míra stresu nejvyšší, ze všech zkoumaných skupin vzorků. Avšak i zde jsou různé faktory, které tuto skutečnost ovlivnily. Z těchto zjištění vyplývá, že nejvíce stresujícími faktory pro mechorosty jsou prachové částice a jiné cizorodé látky, které brání fotosyntéze, průběžné vlhčení vzorků a nanočástice ZnO.



Graf č. 1.: Naměřené koncentrace AsA v jednotlivých skupinách

Graf 2 představuje srovnání vlivu jednotlivých působících stresujících faktorů na průměrnou koncentraci AsA ve vzorcích. Pro první srovnání lze uvést rozdíl průměrných hodnot koncentrace AsA pro původní úpravu vzorků, kdy byly jednotlivé vzorky neumyty nebo umyty, dosahovaly hodnoty AsA pro neumyté vzorky 0,085 mg/g a pro umyté vzorky 0,0122 mg/g. Pro další faktory, jimiž jsou vytvořené podmínky, kdy byly vzorky vlhčeny nebo sušeny byly hodnoty průměrné koncentrace AsA pro vlhčené vzorky 0,095 mg/g a pro sušené vzorky 0,115 mg/g. A nakonec hodnoty průměrné koncentrace AsA pro vzorky exponované a neexponované. Kdy hodnota průměrné koncentrace AsA pro stresující faktor ZnO dosahuje 0,094 mg/g a pro destilovanou vodu dosahuje 0,117 mg/g.

Z těchto informací je zřejmé, že největšími stresory byly nanočástice ZnO a podmínky, kdy byly vzorky neumyty a průběžně vlhčeny.



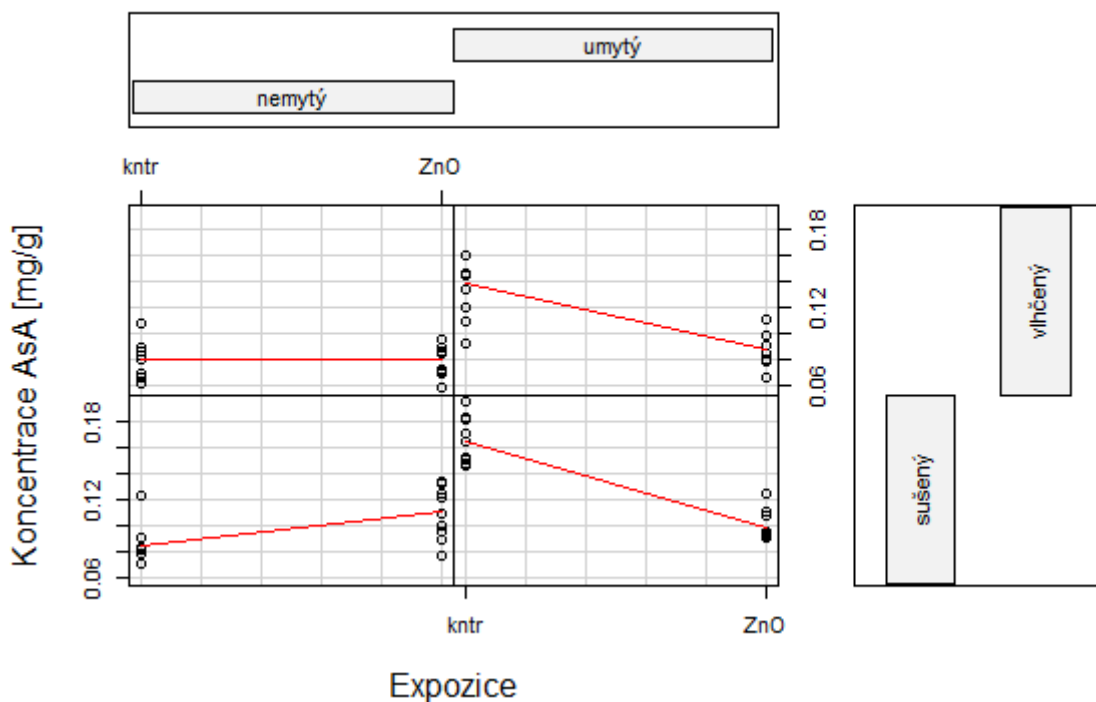
Graf č. 2.: Srovnání působících faktorů

Graf 3 představuje srovnání neexponovaných vzorků s exponovanými v závislosti na navozených podmínkách. Z grafu je vidět, že nejmenší rozdíl v množství AsA je u skupin nemytých, vlhčených vzorků. Kdy hodnoty koncentrace AsA jsou shodné u neexponovaných i exponovaných vzorků. Hodnota AsA se pohybovala okolo 0,08 mg/g.

Mezi zajímavé vyhodnocení patří vzorky skupin neumytých, sušených vzorků. Tyto vzorky vykazovaly nižší hodnotu koncentrace AsA ve vzorcích neexponovaných. V tomto případě rostlinám více uškodily podmínky experimentu nežli samotná expozice nanočásticím ZnO.

Další dvě části grafu představují nejvýznamnější zjištění. U těchto vzorků je po expozici nanočásticím ZnO hodnota koncentrace AsA v rostlinách nízká. V důsledku vytvořeného stresu, které nanočástice oxidu kovu způsobily. U skupin vzorků, které byly umyty a vlhčeny se koncentrace AsA ve vzorcích pohybovala okolo 0,14 mg/g u neexponovaných vzorků a kolem 0,09 mg/g u exponovaných vzorků. S podobným výsledkem byly vyhodnoceny i skupiny vzorků, které byly umyty a sušeny. Hodnoty koncentrace AsA u neexponovaných

vzorků dosahovala hodnoty 0,17 mg/g a u exponovaných vzorků dosahovala 0,09 mg/g. Poškození vyvolané nanočásticemi ZnO bylo tedy značné.



Graf č. 3.: Křížové srovnání vzorků

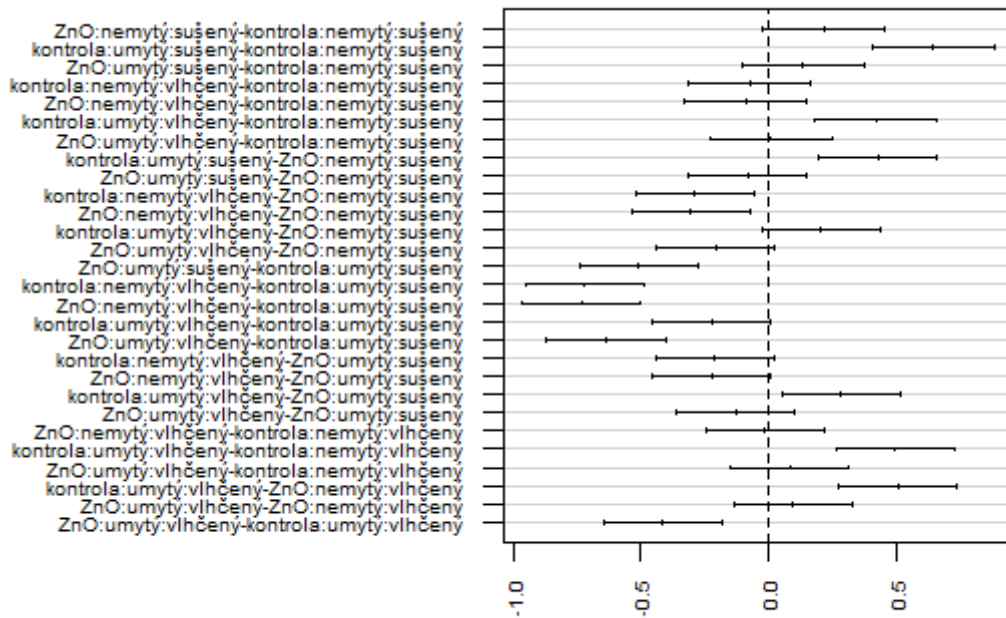
Tabulka č. 3.: Vliv jednotlivých faktorů na koncentraci AsA, analýza variance, výstup z programu R

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
NP	1,00	0,62	0,62	25,13	0,00	***
mytí	1,00	1,46	1,46	58,93	0,00	***
vlhčení	1,00	0,62	0,62	25,15	0,00	***
NP:mytí	1,00	1,39	1,39	56,11	0,00	***
NP:vlhčení	1,00	0,02	0,02	0,74	0,39	
mytí:vlhčení	1,00	0,00	0,00	0,05	0,83	
NP:mytí:vlhčení	1,00	0,12	0,12	4,78	0,03	*
Residuals	63,00	1,56	0,02			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						
1 observation deleted due to missingness						

Ze statistické analýzy (analýza variance, ANOVA) provedené na datech (viz tab. č. 3) ze zjištěné koncentrace AsA ve vzorcích mechu vztažených k faktorům předpřípravy vzorků a expozice vyplývá, že největší vliv má expozice nanočásticím ZnO ($p = 4,63 \cdot 10^{-6}$), mytí vzorků ($p = 1,31 \cdot 10^{-10}$) a vlhčení, respektive sušení před expozicí ($p = 4,59 \cdot 10^{-6}$). Dále byl prokázán společný vliv expozice nanočásticím ZnO a mytí vzorků ($p = 2,77 \cdot 10^{-10}$) a menší i když stále významný společný vliv kombinace expozice, mytí a vlhčení ($p = 0,0324$).

V grafu 4 je znázorněno srovnání všech možných kombinací skupin vzorků vyplývající z výsledků Tukey HSD testu. Obsahem AsA se nejméně lišily porovnané vzorky skupin umyté, vlhčené exponované spolu s nemyté, sušené, neexponované. A dále také vzorky skupin nemyté, vlhčené, exponované spolu s nemyté vlhčené neexponované. Tyto dvě porovnání vykazovaly nejmenší rozdíly, byly téměř shodné. Na druhou stranu největší možné rozdíly množství AsA v rostlinách vykazovaly po srovnání skupiny umyté, sušené, neexponované spolu s nemyté, sušené, exponované. Dále skupiny vzorků nemyté, vlhčené, neexponované spolu s umyté, sušené, neexponované a také srovnání nemyté, vlhčené, exponované spolu s umyté, sušené, neexponované. Tyto tři srovnání dávaly největší rozdíly v obsahu AsA.



Differences in mean levels of NP:mytí:vlhčení

Graf č. 4.: Srovnání všech možných kombinací skupin

4 Diskuze

Nejvyšší množství AsA v rostlinách obsahovaly vzorky, které byly před expozicí umyty a sušeny. Zde byla vyvolaná stresová reakce nejmenší. Menší množství AsA a tedy větší množství stresu pak vykazovaly vzorky, které byly zpracovány z místa odběru bez mytí před jejich následnou expozicí. A nejmenší obsah AsA vykazovaly vzorky, které byly vystaveny expozici nanočásticím ZnO. Tato expozice v jednotlivých vzorcích rostlin vyvolala nejvyšší míru stresu, a tedy byla zapotřebí nejvyšší spotřeba AsA. AsA se spotřebovala na opravu rostlinných částí poškozených vyvolaným stresem.

Ze získaných výsledků je zřejmá rostoucí míra stresu od neexponovaných vzorků po ty exponované, v závislosti na podmínkách experimentu a délce expozice. Stresová reakce byla vyvolána u všech zkoumaných vzorků, avšak v různé míře, která byla závislá na navozených podmínkách. Ty byly rozděleny do osmi sekcí, podle toho, zdali byli vzorky zpracovány z místa odběru umytím/neumytím, vlhčením/sušením před jejich následnou neexpozicí/expozicí. Nejvyšší množství AsA zůstalo u skupiny vzorků, které byly nejdříve umyty, poté sušeny a neexponovány. Došlo zde k nejnižší spotřebě AsA v důsledku vyvolaného stresu u mechu. Čili jsou tyto podmínky (vzorky umyty, poté sušeny) pro mech z hlediska vyvolaného stresu nejprůzračnější. Srovnání jednotlivých skupin vzorků neexponovaných s exponovanými s těmito podmínkami výzkumu, poskytuje informaci o tom, že expozice nanočásticím ZnO velice podpořila vyvolání stresové situace v rostlině. Hodnota koncentrace AsA u neexponovaných vzorků dosahovala 0,17 mg/g a u exponovaných vzorků 0,09 mg/g. Což je rozdíl řádově 0,08 mg/g mezi těmito dvěma skupinami vzorků. Při tak nízkých celkových koncentracích je tento rozdíl vysoký. Při těchto podmínkách byly nanočástice ZnO závažným stresorem. Při dalším srovnání v závislosti na stejných experimentálních podmínkách a neexpozici/expozici je patrné (graf 1), že vlhčení vzorků do určité míry ovlivňuje objektivní srovnání závažnosti nanočástic ZnO jako stresoru. Vzorky, které byly průběžně vlhčeny samy o sobě vykazují nízké hodnoty AsA ve struktuře rostliny: 0,08 mg/g a 0,15 mg/g u neexponovaných vzorků. U exponovaných vzorků nanočásticemi ZnO dosahuje u vlhčených vzorků koncentrace AsA v rostlinách hodnoty okolo 0,08 mg/g. Toto je srovnatelné se vzorky neexponovanými. Průběžné vlhčení oddělených částí rostlin způsobuje přibližně stejnou stresovou reakci v rostlinách jako expozice nanočásticím ZnO. Z celkového hodnocení experimentu vybočuje jedna skupina vzorků. Jedná se o vzorky, které byly po převozu do laboratoře ošetřeny tak, že zůstaly

nemyty a následně byly sušeny. Zde hodnota koncentrace AsA v jednotlivých vzorcích dosahuje hodnoty 0,09 mg/g, což je nízká hodnota pro neexponované vzorky. Ze srovnání s ostatními skupinami použitých vzorků, je zřejmé, že nemytí či sušení rostlinám neškodí natolik aby se hodnota AsA v rostlinách dostala do takovýchto nízkých hodnot. Je tedy pravděpodobné, že tuto anomálii způsobily prachové a jiné cizorodé částice, které bez mytí před expozicí zůstaly na povrchu mechu a zabraňovaly tak zeleným částem rostliny fotosyntetizovat. Znemožnění procesu fotosyntézy je možným důvodem tak nízké koncentrace AsA v nemytých vzorcích.

Z předchozích provedených studií v rámci biomonitoringu vyplynulo, že *Pleurozium schreberi* je schopen do svých stélek ve vysoké míře akumulovat nanočástice ZnO. (Mrázková, 2016), (Zeman, 2015) Což z něj dělá výborný objekt pro použití jakožto biomonitoru. Ovšem zatím není příliš informací o tom, zdali množství akumulovaných částic v rostlině ovlivňuje míru stresové reakce. Dále o tom, zdali je mech jako takový schopen do nekonečna přijímat nanočástice ZnO do svých stélek nebo lze dosáhnout nějaké limitní koncentrace, což by ovšem také mohlo ovlivnit míru vyvolané stresové reakce v těchto rostlinách. A v neposlední řadě možnost ovlivnění stresové reakce v rostlině mechu vlivem přítomnosti dalších prvků z periodické soustavy prvků. Ty mohou být pro rostlinu nejen prospěšné, ale také mohou být stresorem. A spolu s nanočásticemi oxidu kovů mohou v rostlině vyvolat i interakce, pro rostlinu škodlivé, a tedy by se mohlo jednat o další významný stresor, při zjišťování míry vyvolaného stresu u rostlin.

Pro budoucí výzkum by bylo žádoucí najít odpovědi na vše co by mohlo ovlivnit výsledky. Tedy rozšířit informace právě o tom, zdali jsou možné interakce nanočástic ZnO s některými dalšími prvky v rostlinách. Dále zjistit, zdali nízká koncentrace nanočástic ZnO vyvolá stejnou stresovou reakci jako koncentrace vysoká. Celkově pro experiment by bylo vhodné navodit podmínky, kdy by bylo zřejmé, že tyto podmínky ovlivní stresovou reakci pouze minimálně. Z provedeného experimentu vyplývá, že nejvhodnější podmínky pro vzorky jsou mytí a následné sušení. A v neposlední řadě by bylo dobré mít informace o tom, zdali mech přijímá nanočástice oxidu kovů stejným způsobem a ve stejném množství, pokud je ve fázi celé rostliny, v lese (případně v květináči v laboratorních podmínkách) nebo pokud jsou odebrány pouze zelené vrcholové části rostliny. Zdali to má vliv na množství a místo akumulace těchto nanočástic v rostlině. V případě, kdy by se prokázalo, že je to odlišné,

mohly by se potenciální výsledky stát neadekvátní, jelikož by to nedávalo úplnou informaci o dopadu na životní prostředí.

Je dokázáno, že využití mechů jako biomonitorů je nejen efektivní, ale také o jednodušší variantu pro experiment, jelikož to jsou rostliny bezcévné. Zároveň se jedná o levnou variantu vzorků, kdy mech roste teoreticky všude, za jakýchkoli podmínek, které jsou dobré pro následné srovnávání. Dlouhodobé sledování by bylo pro biomonitoring přínosné a představovalo by efektivní metodu kontroly a hodnocení vlivu znečištění nanočásticemi na životní prostředí.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovení míry fyziologického stresu v buňkách známého biomonitoru *Pleurozium schreberi*, jenž se řadí k mechorostům. Dále stanovení stresu po expozici suspenzi nanočástic ZnO a následné srovnání se vzorky neexponovanými, kdy indikátor stresu byl obsah kyseliny askorbové ve stélce mechu. Jedná se o první využití této metody stanovení koncentrace AsA za účelem zjištění míry stresu u rostlinného biomonitoru. Metoda se ukázala být účinná v hodnocení vyvolaného stresu stresorem na rostliny. Její využití je vhodné i pro hodnocení znečištění nanočásticemi oxidy kovů v prostředí.

Experimentálně byla stanovena míra vyvolaného stresu pro vzorky neexponované a exponované nanočásticím ZnO. Vzorky byly rozděleny do osmi skupin a výsledky se lišili v závislosti na navozených podmínkách experimentu. Ze získaných dat bylo zjištěno, že největší dopad na *Pleurozium schreberi* měla expozice nanočásticím ZnO u vzorků, které byly průběžně vlhčeny. Menší dopad byl poté pozorován u vzorků po expozici, které byly zpracovány z místa odběru umytím a sušením před jejich následnou expozicí. A nejmenší dopad byl pozorován u vzorků, které byly před expozicí nemyty a sušeny. Množství AsA u vzorků neexponovaných byly ve srovnání s těmi exponovanými vyšší až vysoké. Tedy i když podmínky ve kterých se rostlina nachází jistou mírou vyvolává stresové reakce v rostlině, mnohem vyšším stresorem jsou právě nanočástice ZnO.

Každá metoda se potýká s nedostatky, které mohou být minimalizovány dalším rozvojem a výzkumem, aby bylo možné docílit zlepšení biomonitoringu. Rozšířením možností srovnání různých podmínek, druhu exponovaných nanočástic, nových titračních činidel by mohla využitá metoda přispět k rozvoji znalostí možného dopadu nanočástic na životní prostředí. Takovéto informace by rozšířily znalosti o interakcích pevných látek s rozměry řádově nanometrů s živými organismy. Tím by dávaly jistou informaci také o půdě, vodě apod. Všechny údaje by pomohly dalšímu rozvoji studiím o celkovém účinku nanočástic na životní prostředí.

POUŽITÁ LITERATURA

2011/696/EU, 2011. *Doporučení komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu.*

AUGUSTI, A, A SCARTAZZA, F NAVARI-IZZO, CLM SGHERRI, B STEVANOVIC a E BRUGNOLI, 2001. Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Photosynthesis Research*. **67**(1-2), 79-88.

BARTOLI, CG, JP YU, F GOMEZ, L FERNANDEZ, L MC INTOSH a CH FOYER, 2006. Interrelationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*. **57**(8), 1621-1631.

BOQUETE, M.T., J.R. ABOAL, A. CARBALLEIRA a J.A. FERNÁNDEZ, 2013. *Effect of age on the heavy metal concentration in segments of Pseudoscleropodium purum and the biomonitoring of atmospheric deposition of metals.* DOI: 10.1016/j.atmosenv.2013.12.039. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231013009849>

CYRUSOVÁ, Tereza, Radka PODLIPNÁ a Tomáš VANĚK, 2015. Vliv nanočástic na rostliny. *Chemické listy*. **109**, 276-280.

DAT, J., S. VANDENABEELE, E. VRANOV, M. VAN MONTAGU, D. INZÉ a F. VAN BREUSEGEM, 2002. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. **57**(5), 779-795. DOI: 10.1007/s000180050041. ISSN 1420-682x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s000180050041>

DAVEY, MW, M VAN MONTAGU, D INZE et al., 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**(7), 825-860.

DOLATABADIAN, A, SAMM SANAVY a NA CHASHMI, 2008. The effects of foliar application of ascorbic acid (Vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*. **194**(3), 206-213.

DU, Wenchao, Wenjuan TAN, Jose PERALTA-VIDEA, Jorge GARDEA-TORRESDEY, Rong JI, Ying YIN a Hongyan GUO, 2016. *Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: Physiological and biochemical aspects.* DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.024. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942816301395>

EICHERT, Thomas, Andreas KURTZ, Ulrike STEINER a Heiner GOLDBACH, 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*. **134**(1), 151-160. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x. ISSN 00319317. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x>

FUJITA, M, Y FUJITA, Y NOUTOSHI, F TAKAHASHI, Y NARUSAKA, K YAMAGUCHI-SHINOZAKI a K SHINOZAKI, 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*. **9**, 436-442.

GLIME, J.M., 2013. *Bryophyte Ecology: Chapter 2: Life Cycles and Morphology* [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <<http://www.bryoecol.mtu.edu/>>

GOEL, Anju a Prashant KUMAR, 2014. A review of fundamental drivers governing the emissions, dispersion and exposure to vehicle-emitted nanoparticles at signalised traffic intersections. *Atmospheric Environment*. **97**, 316-331. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2014.08.037. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231014006311>

GUO, YP, HF ZHOU a LCH ZHANG, 2006. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae*. **108**(3), 260-267.

HAMPL, F a J PALEČEK, 2002. *Farmakologie*. Praha. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.

HIKOSAKA, K. a I. TERASHIMA, 1996. Nitrogen partitioning among photosynthetic components a and its consequence in sun and shade plants. *Funct Ecol*. **10**, 335-343.

CHEN, Z. a D.R. GALLIE, 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*. **16**, 1134. DOI: 10,1105 / tpc.021584.

INZÉ, D. a M. VAN MONTAGU, 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol*. **6**, 153-158.

JOŚKO, Izabela, Patryk OLESZCZUK a Ewa SKWAREK, 2016. *Toxicity of combined mixtures of nanoparticles to plants*. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.028. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389417301164>

JUDY, Jonathan, Jason UNRINE a Paul BERTSCH, 2010. *Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain*. DOI: 10.1021/es103031a. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es103031a>

KARLÍČEK, R, 2001. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Karolinum: Nakladatelství Univerzity Karlovy. Univerzita Karlova.

KRAML, J, 1999. *Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie*. Karolinum: Nakladatelství Univerzity Karlovy. Univerzita Karlova.

KVASNIČKOVÁ, A., 2008. *Aplikace nanotechnologie v potravinářství*.

LALAU, CM, RA MOHEDANO a EC SCHMIDT, 2014. Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. *Protoplasma*. DOI: 10.1007/s00709-014-0671-7.

LEVIN, S., 1992. The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology* 73. **73**, 1943-1967.

LIU, Q., X. ZHANG a Y. ZHAO, 2013. Fullerene-induced increase of glycosyl residue on living plant cell wall. *Environ Sci Technol.* **47**, 7490-7498.

MARKERT, Bernd, 2007. *Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment*. DOI: 10.1016/j.jtemb.2007.09.015. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X07001113>

MASAŘ, Milan, 2013. *Příprava ZnO sub-mikro a nanostruktur*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Michal Machovský.

MINGYU, S, W XIAO a L CHAO, 2007. Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO₂. *Biol Trace Elem Res.* **119**, 183-192.

MIRALLES, Pola, Tamara CHURCH a Andrew HARRIS, 2012. Toxicity, Uptake, and Translocation of Engineered Nanomaterials in Vascular plants. *Environmental Science.* **46**(17), 9224-9239. DOI: 10.1021/es202995d. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es202995d>

MITTLER, Ron, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science.* **7**(9), 405-410. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9. ISSN 13601385. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138502023129>

MRÁZKOVÁ, V., 2016. *Distribuce a akumulace nanočástic oxidů kovů v mechu*. Ostrava. Diplomová práce. VŠB-TUO. Vedoucí práce Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.

MUSTAFA, Ghazala a Setsuko KOMATSU, 2016. *Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants*. DOI: 10.1016/j.bbapap.2016.02.020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963916300334>

NAVARRO, Enrique, Anders BAUN, Renata BEHRA et al., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology.* **17**(5), 372-386. DOI: 10.1007/s10646-008-0214-0. ISSN 0963-9292. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-008-0214-0>

NEILL, S.J., R. DESIKAN, A. CLARKE, R.D. HURST a J. HANCOCK, 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Exp. Bot.* **53**, 1237.

PAOLACCI, AR, M BADIANI, A DANNIBALE, A FUSARI a G MATTEUCCI, 1997. Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *Triticum durum* Desf seedlings acclimated to nonstressing high temperature. *Journal of Plant Physiology.* **150**(4), 381-387.

PILOUS, Z. a J. DUDA, 1960. *Klíč k určování mechorostů ČSR*. 1. Praha: Nakladatelství československé akademie věd.

PITERKOVÁ, Jana, Kateřina TOMÁNKOVÁ, Lenka LUHOVÁ, Marek PETŘIVALSKÝ a Pavel PEČ, 2005. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy.* (99), 455-466.

PRAJAPATI, SK a BD TRIPATHI, 2008. Seasonal variation of leaf dust accumulation and pigment content in plant species exposed to urban particulates pollution. *Journal of Environmental Quality*. **37**(3), 865-870.

PROCHÁZKA, S., I. MACHÁČKOVÁ, J. KREKULE a J. ŠEBÁNEK, 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Akademie.

R CORE TEAM, , 2016. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN <https://www.R-project.org/>.

R CORE TEAM: *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. [online], 2016. [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <https://www.R-project.org/>

RICO, CM., J. HONG a MI. MORALES, 2013. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. *Environ Sci Technol*. **47**, 5635-5642.

ROBINSON, JM a SJ BRITZ, 2000. Tolerance of a field grown soybean cultivar to elevated ozone level is concurrent with higher leaflet ascorbic acid level, higher ascorbate-dehydroascorbate redox status, and long term photosynthetic productivity. *Photosynthesis Research*. **64**(1), 77-87.

RUHLING, A. a G. TYLER, 1968. An ecological approach to the lead problem. *Botaniska Notiser*. **122**, 248-342.

SAISON, C., JC PERREAULT a DAIGLE, 2009. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol*. **96**, 109-114.

SANDERSON, Paul, Juana DELGADO-SABORIT a Roy HARRISON, 2014. A review of chemical and physical characterisation of atmospheric metallic nanoparticles. *Atmospheric Environment*. **94**, 353-365. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2014.05.023. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231014003707>

SCANDALIOS, J.G., 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet*. **28**, 1-41.

SEDLÁK, Jakub, 2010. *Zinečnatá plniva s polymerním potahem*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ivo Kuřitka.

SHAO, HB, LY CHU, MA SHAO a Aj CHERUTH, b.r. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*. **331**(6), 433-441.

SIDDIQUI, , H MANZER, Mohammed H. AL - WHAIBI a Firoz MOHAMMAD, 2015. *Nanotechnology and plant sciences*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 303 s. ISBN 978-331-9145-013.

SMIRNOFF, N, 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. **78**(6), 661-669.

SMIRNOFF, N, 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and function: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. *Blackwell Publishing Ltd*. Oxford, 53-66.

SYTAR, Oksana, Marian BRESTIC, Nataliya TARAN a Marek ZIVCAK, b.r. *Plants Used for Biomonitoring and Phytoremediation of Trace Elements in Soil and Water*. DOI: 10.1016/B978-0-12-803158-2.00014-X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012803158200014X>

TRIPATHI, Durgesh, SHWETA, Shweta SINGH et al., 2016. *An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity*. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.07.030. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942816302972>

URSACHE-OPRISAN, M., E. FOCANICI a D. CREANGA, 2011. Sunflower chlorophyll levels after magnetic nanoparticle supply. *Afr J Biotechnol.* **10**, 7092-7098.

UŠAKOVA, RNDr., prof. HUDÁK, doc. KRAJČOVIČ a RNDr. SEMAN, 1999. *Biologie I*. Ministerstvo školství ČR, Bratislava. ISBN 80-08-02983-8.

VACCA, R.A., M.C. DE PINTO, D. VALENTI, S. PASSARELLA a E MARRA, 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.* **134**. DOI: 10.1104/pp.103.035956.

VÁŇA, Jiří, 2006. *Obecná bryologie*. Praha. Skripta. Univerzita Karlova v Praze.

VRANOVA, E., 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany.* **53**(372), 1227-1236. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1227. ISSN 14602431. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jexbot/53.372.1227>

WEI, C., Y. ZHANG a J. GUO, 2010. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. *J Environ Sci.* **22**, 155-160.

WIN-SHWE, Tin-Tin, Shoji YAMAMOTO, Yuji FUJITANI, Seishiro HIRANO a Hidekazu FUJIMAKI, 2011. Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice. *Nanotoxicology.* **6**(5), 543-553. DOI: 10.3109/17435390.2011.590904. ISSN 1743-5390. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2011.590904>

ZEMAN, P., 2015. *Bioakumulace nanočástic oxidů kovů v mechorostech*. Ostrava. Diplomová práce. VŠB-TUO. Vedoucí práce Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.

ZHANG, , X HE, H ZHANG, Y MA, P ZHANG, Y DING a Y ZHAO, 2011. Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. *Metallomics.* **3**(8), 816-822. DOI: 10.1039/clmt00049g.

ZHANG, L., ZN WANG, Y XIA, GY KAI, WS CHEN a KX TANG, 2007. Metabolic engineering of plant L-ascorbic acid biosynthesis: recent trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. **27**(3), 173-182.

ZHU, Hao, Jie HAN, John XIAO a Yan JIN, 2008. *Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants*. DOI: 10.1039/b805998e. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b805998e>

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1.: Naměřené koncentrace AsA v jednotlivých skupinách

Graf č. 2.: Srovnání působících faktorů

Graf č. 3.: Křížové srovnání vzorků

Graf č. 4.: Srovnání všech možných kombinací skupin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1.: Gametofyt a sporofyt

Obrázek č. 2.: Schématický diagram fyziologických a biochemických efektů

Obrázek č. 3.: Stresové faktory

Obrázek č. 4.: Vzorky po převozu do laboratorních podmínek

Obrázek č. 5.: Dělení vzorků podle experimentálních podmínek

Obrázek č. 6.: Aplikace suspenze ZnO

Obrázek č. 7.: Filtrace vzorků

Obrázek č. 8.: Filtrace

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1.: Rozdělení vzorků pro experiment

Tabulka č. 2.: Rozdělení vzorků

Tabulka č. 3.: Vliv jednotlivých faktorů na koncentraci AsA, analýza variance, výstup z programu R

SEZNAM ZKRATEK

ANOVA	analýza rozptylu
AsA	kyselina askorbová
DNA	dvouřetězová nukleová kyselina (nositel dědičnosti)
CHKO	chráněná krajinná oblast
nano-ZnO	nanočástice oxidu zinku
RNA	ribonukleová kyselina (podobná DNA)
ROS	reaktivní formy kyslíku