

# AFFECTING OF MAIZE PLANTS BY PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS – PERSPECTIVES FOR PHYTOREMEDIATION TECHNOLOGIES

## VLIV PERZISTENTNÍCH ORGANICKÝCH POLUTANTŮ NA ROSTLINY KUKUŘICE – VYUŽITÍ PRO PHYTOREMEDIATION TECHNOLOGIE

**Kryštofová O.<sup>1,2)</sup>, Stejskal K.<sup>2)</sup>, Šobrová P.<sup>1)</sup>, Baloun J.<sup>1,3)</sup>, Adam V.<sup>2)</sup>, Havel L.<sup>3)</sup>, Klánová J.<sup>1)</sup>, Kizek R.<sup>2)</sup>**

<sup>1</sup>Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii – RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno; <sup>2</sup>Ústav chemie a biochemie, a <sup>3</sup>Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

E-mail: [olga.krystofova@seznam.cz](mailto:olga.krystofova@seznam.cz), [kizek@sci.muni.cz](mailto:kizek@sci.muni.cz)

---

### ABSTRACT

Persistent organic pollutants (POPs) belong to the most toxic and dangerous compounds due to their ability to tend to accumulate in different parts of environment. Thus, we aimed on investigation of influence of POPs on growth and thiols content (cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin) in maize plants. Maize plants (*Zea mays*) were treated by POPs (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1 nM) for fourteen days under controlled conditions. The thiols content in roots were slightly higher in comparison with aboveground parts. This phenomenon probably relates with detoxification processes taking place in the roots. Moreover, the growth of the treated plants was stimulated in comparison with control.

**Keywords:** thiols, phytoremediation, organic pollutants, plants, maize, electrochemistry.

### ABSTRAKT

Mezi jedny z velmi nebezpečných toxických látek, kterou jsou schopny se akumulovat v různých složkách životního prostředí, patří perzistentní organické polutanty (POPs). Proto jsme se v této práci zaměřili na studium vlivu různých POPs na růst rostlin kukuřice a obsah thiolových sloučenin (cysteinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu, a fytochelatinu). V našich experimentech byly rostliny kukuřice seté (*Zea mays*) vystaveny působení 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 a 1 nM směsi POPs po dobu čtrnácti dnů za kontrolovaných podmínek. V kořenech byly obsahy jednotlivých thiolů mírně zvýšené v porovnání s nadzemními částmi rostlin, což zřejmě souvisí s procesy, které probíhají přímo v kořenech. A navíc, exponované rostliny rostly výrazně lépe v porovnání s kontrolní variantou.

**Klíčová slova:** thioly, fytoremediace, organické polutanty, rostliny, kukuřice, elektrochemie.

## ÚVOD

V prostředí kolem nás se nachází stále vyšší obsah toxických látek spojený především s průmyslovou a zemědělskou činností člověka. Mezi jedny z velmi nebezpečných toxických látek patří perzistentní organické polutanty (POPs). POPs jsou látky, které mohou setrvávat dlouhý čas v prostředí a být přenášeny na velké vzdálenosti mezi všemi složkami prostředí a díky své povaze se koncentrovat v potravinových řetězcích. V důsledku toho pak mohou způsobovat toxické efekty (reprodukční, vývojové a na imunologický systém), a proto je nutné sledovat jejich transport mezi jednotlivými složkami systému a jejich kumulaci v živých organismech.

Nedávno byly objeveny rostlinné druhy, které jsou schopny organické polutanty akumulovat bez viditelné deprese a zpomalení růstu. Těto schopnosti je možné využívat v nových biotechnologických procesech (např. fytoremediace) založených na dekontaminaci půd nebo vodních zdrojů s vysokými obsahy organických polutantů rostlinami, které slouží jako hyperakumulátory organických polutantů [1-6].

Každá oblast, kontaminovaná určitým typem organických nebo anorganických látek, vyžaduje jiný typ rostliny nebo vyšší počet rostlinných druhů ve skupině. Často bývá používána vojtěška (*Cytisus*) pro svoji schopnost fixovat dusík a díky vlastnostem kořenů, které dosahují vhodné hloubky [7]. Velmi výhodné pro fytoremediaci jsou stromy z rodu *Salicaceae* (topoly a vrby), které jsou odolné a velmi rychle rostou. Jiný rostlinný systém, hybridní topoly, nabízí také různé výhody pro dekontaminaci znečištěné půdy především organickými kontaminanty. Tyto hybridy jsou stabilní, dlouho žijící (25-50 let), rychle rostou a snášejí poměrně vysoké koncentrace organických látek. Hybridní topoly rostou z dlouhých štěpů zasazených hluboko do půdy, mohou být pokáceny a přesazeny z kusů kořenů. Pro odstraňování lipofilních polutantů byly při testech na polích použity tykev obecná (*Cucurbita pepo* L. convar, *giromontiina* cv. Diamant F1), dýně obecná (*Cucurbita pepo* L. cv. Gerber Zentner) a okurka setá (*Cucumis sativus*). Tykve a dýně vykazovaly vysokou schopnost akumulace dibenzofuranů z půdy, okurky pak vyšší schopnost absorpce ze vzduchu [8].

Cílem naší práce bylo stanovit obranné rostlinné thiolové sloučeniny (cystein, redukovaný a oxidovaný glutation, a fytochelatin) pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí v rostlinách kukuřice vystavených působení různých koncentrací POPs.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Chemikálie*

Acetonitril a methanol (HPLC-čistota) byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Standardy PC<sub>2</sub>, PC<sub>5</sub> a DesGlyPC jsme získali od firmy Clonostar Brno. Všechny další chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA) pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 100 µg.ml<sup>-1</sup>) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich,

USA) a uchovány ve tmě při 4 °C. Pracovní roztoky byly ze zásobního připravovány každý den nové. Všechny roztoky byly před HPLC analýzou filtrovány přes teflonový filtr 0.45 µm (MetaChem, Torrance, CA, USA). Hodnoty pH byly stanoveny pomocí MV870 pH meter (Praecitronic, Německo). pH metr byl pravidelně kalibrován pomocí sady NBS pufrů. Voda byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěná pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18 MΩ) (pro kultivační medium).

### ***Kultivace rostlin***

V našich experimentech byla použita semena kukuřice (*Zea mays* L.) F1 hybrid Gila. Semena byla naklíčena na vlhkém filtračním papíře ve speciálních nádobách po dobu sedmi dnů při teplotě  $23 \pm 2$  °C ve tmě. Po sedmi dnech byla naklíčená semena přemístěna do truhlíku s vodou, kde byla kultivována v kultivačním boxu při 23.5 – 25 °C, vlhkosti vzduchu 71 – 78 % a maximální intenzitě světla okolo  $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (přísun světla 14 hodin/den) po dobu osmi dnů. Následně byla voda v truhlících nahrazena roztoky CI-PEST o různé koncentraci (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 a 1 nM). Koncentrace 0 nM sloužila jako kontrola. Experiment trval čtrnáct dní a 1., 5., 6., 7., 11., 12., 13. a 14. den experimentu byly odebírány dvě rostliny od každé varianty. Po odběru byly rostliny třikrát omyty v destilované vodě, a následně byla jedna rozdělena na listy a kořen, přičemž druhá byla pouze vysušena.

### ***Příprava biologických vzorků pro stanovení thiolových sloučenin***

Listy a kořeny kukuřice (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 byly homogenizován pomocí třepání na Vortex-2 Genie po 45 min při 4 °C (Scientific Industries, USA). Homogenát byl centrifugován (3 000 g) 30 min při 4 °C pomocí Universal 32 R centrifugy (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo) [9,10]. Supernatant byl filtrován přes membránový filtr (0.45 µm, Millipore).

### ***Elektrochemické stanovení ve thiolových sloučenin***

Získaný supernatant byl analyzován pomocí vysoce účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC- ED). HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0.001-9.999 ml min<sup>-1</sup>) a chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A (150 × 4.6; 3 µm velikost částic, Varian Inc., CA, USA) a osmi-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA), popřípadě reakční smyčky (1 m) pro průtokovou injekční analýzu (FIA). Detektor je složen z průtočné analytické komůrky (Model 6210, ESA, USA) obsahující referentní (hydrogen paládiová), pomocnou a osm porézních grafitových elektrod. V řídicím modulu je uložena chromatografické kolona, elektrochemický detektor a celý prostor je termostatovaný.

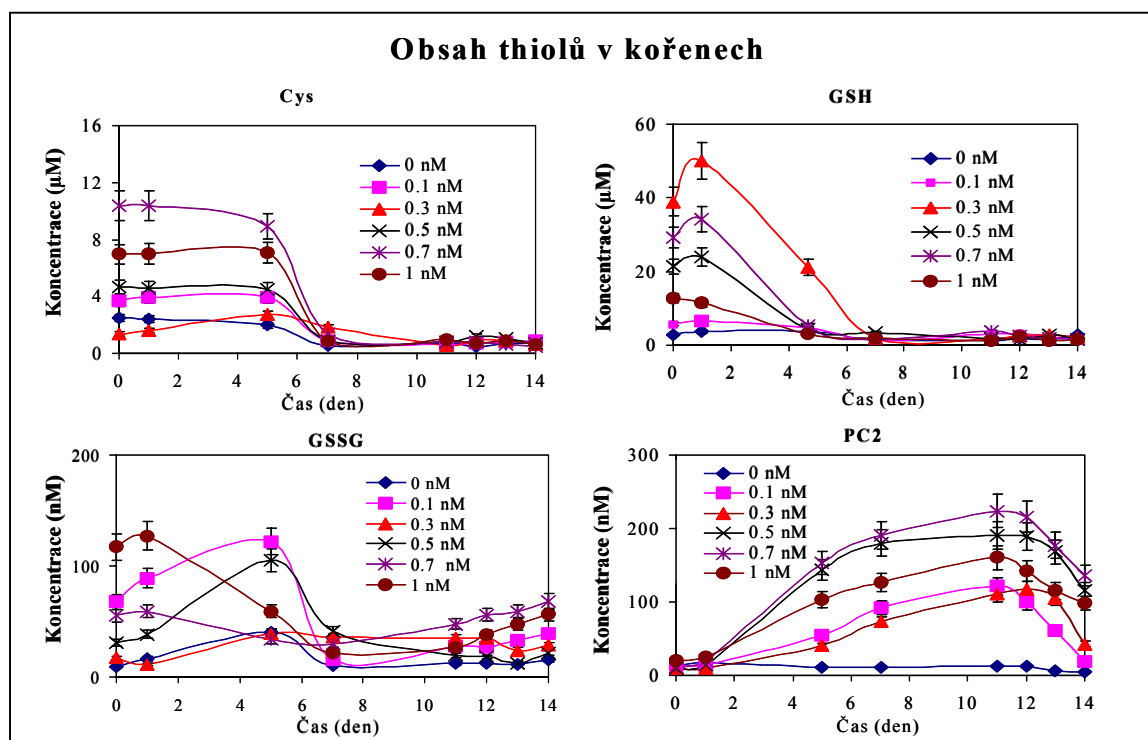
## VÝSLEDKY A DISKUZE

Je známo, že rostliny syntetizují celou skupinu thiolových sloučenin jako ochranu před toxickým působením těžkých kovů (vznik kyslíkových radikálů) [11-13]. Vztah thiolů a organických polutantů nebyl ještě podrobněji studován. V našich experimentech byly rostliny kukuřice seté (*Zea mays*) vystaveny působení 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 a 1 nM směsi POPs po dobu čtrnácti dnů v kultivační místnosti při teplotě 20-25°C při světelném režimu 14 h den. Z jednotlivých kultivačních boxů byly odebrány ve dnu experimentu (1., 5., 6., 7., 11., 12. a 13.) vždy dvě rostliny. První rostlina byla použita pro stanovení obsahu POPs a druhá pro sledování změny hladiny thiolových látek.

Prvním studovaným parametrem vlivu rozdílné koncentrace chlorovaných uhlovodíků na rostliny kukuřice (odrůda Gila) byly základní růstové charakteristiky. V průběhu experimentu jsme zjistili, že POPs velmi intenzivně stimulují růst kukuřice. Všechny rostlinky dobře rostly, nebyla pozorována žádná růstová deprese ani chloróza či jiné příznaky zhoršeného stavu rostliny. Rostliny byly robustnější s dobře vyvinutým kořenovým systémem. V případě, že byly rostliny kukuřice kultivovány bez přídavku POPs byla pozorována výrazná růstová deprese, rostliny byly slabé, poléhavé s typickými příznaky chlorózy. Na konci experimentu byly v porovnání mezi sebou o více jako 50 % menší. Tento zajímavý výsledek ukazuje na výrazný stimulační efekt POPs na rostliny kukuřice. Vysvětlení pozorovaného jevu však není snadné. Pravděpodobně dochází ke zvýšení aktivity řady enzymů včetně intenzity fotosyntézy, což umožní nárůst biomasy rostlin.

V dalších experimentech byl studován obsah Cys, GSH, GSSG a PC<sub>2</sub> při jednotlivých studovaných koncentracích POPs v nadzemních částech rostliny a v kořenech (Obr. 1). V kořenech byly obsahy jednotlivých thiolů mírně zvýšené v porovnání s nadzemními částmi rostlin, což zřejmě souvisí s detoxikačními procesy, které probíhají přímo v kořenech. V prvních pěti dnech dochází k nárůstu obsahu Cys a GSH, a posléze dochází k poklesu obsahu těchto thiolů na úroveň odpovídající přibližně obsahu kontroly. Zvýšenou odpověď především vyvolávaly aplikované koncentrace POPs od 0.5 do 0.7 nM. U 1 nM POPs byly pozorovány poměrně nízké obsahy jak Cys tak GSH a navíc v dalších dnech byl obsah Cys a GSH nižší než u kontrolních rostlin. Dále byl pozorován výrazný vzestup hladiny GSSG do 5 dnů experimentu s jeho velmi prudkým propadem kolem 6. až 7. dne a následným, již pozvolným vzestupem. Změny hladiny GSSG na počátku experimentu pravděpodobně souvisí s vzestupem kyslíkových radikálů, které do rostliny POPs zcela jistě přináší [14]. Prudký pokles asi značí intenzivní zapojení kyslíkových lapačů do stresové obrany rostliny, což může podpořit i následný již postupný nárůst GSSG v dalším období. Podobný a zajímavý průběh je pozorován i v případě PC<sub>2</sub>, kdy jeho koncentrace nejdříve postupně vzrůstá do 12. dne experimentu. Poté dochází k mírnému poklesu PC<sub>2</sub>. U nejnižších aplikovaných koncentrací POPs je tento obsah velmi blízký hladině PC<sub>2</sub> u kontroly. Obdobné závislosti byly pozorovány i v nadzemních částech rostlin, avšak jednotlivé pozorované závislosti nebyly tak strmé a změny v hladinách byly výrazně pozvolnější.

Obr. 1 Obsah thiolů v kořenech rostlin kukuřice vystavených působením POPs po dobu čtrnácti dní, který byl analyzován pomocí HPLC-ED techniky.



Dále jsme se zaměřili na sledování vlivu POPs na klíčení obilky kukuřice. Byly testovány čtyři koncentrace POPs (0.1, 0.3, 0.5 a 1 nM). V prvním dni experimentu všechna semena intenzívně bobtnala, nebyly pozorovány žádné rozdíly. Ve druhém dni se objevili první klíčky a nejvyšší klíčivost (okolo 30 %) byla pozorována u koncentrace 0.5 nM. Ve třetím dni experimentu byly pozorovány klíčky již u všech testovaných koncentrací POPs. V dalším dni byl pozorován maximální vliv na klíčivost při koncentraci POPs 0.3 nM (88% klíčivost). V pátém dni experimentu je dobře pozorovatelný intenzivní růst klíčků ovlivněných POPs 0.3 nM v porovnání s kontrolou a dalšími koncentracemi. V 6. a 7. dni experimentu je velmi dobře patrný rozdíl mezi kontrolou a klíčovými semeny kukuřice v přítomnosti 0.1 a 0.3 nM POPs. V poslední den byly odebrány jednotlivé obilky kukuřice a z nich získány celé klíčky. Na jednotlivých klíčcích bylo možné rozlišit část kořenovou a část nadzemní. Po jejich rozdělení se klíčky homogenizovali a analyzovaly pomocí AdTS DPV Brdičkovy reakce. Hladina thiolů byla zvýšena u všech aplikovaných koncentrací POPs v porovnání s kontrolou. Navíc v kořenové části byl tento obsah asi o 100–200 % vyšší než v části nadzemní. Dále v nadzemní části byl obsah thiolů více vyrovnávaný, pouze aplikovaná koncentrace 0.5 nM zvýšila obsah asi o 40 %. V kořenové části byl obsah thiolů více závislý na koncentraci aplikovaného POPs. Nejvyšší obsah thiolů byl pozorován u aplikované koncentrace POPs 0.3 nM. Tato koncentrace také nejvíce stimulovala klíčení.

## ZÁVĚR

Studium vlivu organických polutantů na organismy je stále velmi aktuálním předmětem výzkumu mnoha vědeckých skupin po celém světě. V této práci jsme studovali vliv směsi různých organických polutantů na rostliny kukuřice. Především jsme se zaměřili na růst a obsah thiolových látek (cysteinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu, a fytochelatinu). Námi dosažené výsledky by mohly v budoucnu posloužit při aplikaci tohoto rostlinného druhu ve fytořediačních technologiích. Tyto technologie se zdají velmi slibné při odstraňování různých polutantů z rozmanitých složek životního prostředí. Získávají velkou oblibu díky šetrnosti k prostředí, které dekontaminují a zároveň jsou finančně nenáročné.

## LITERATURA

- [1] P. Kucerova, M. Mackova and T. Macek Perspectives of phytoremediation in decontamination of organic pollutants and xenobiotics, *Chem. Listy* 93 (1999) 19-26.
- [2] J.B. Hughes, J. Shanks, M. Vanderford, J. Lauritzen and R. Bhadra Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures, *Environmental Science & Technology* 31 (1997) 266-271.
- [3] A. Wilken, C. Bock, M. Bokern and H. Harms Metabolism of Different Pcb Congeners in Plant-Cell Cultures, *Environmental Toxicology and Chemistry* 14 (1995) 2017-2022.
- [4] M. Mackova, T. Macek, P. Kucerova, J. Burkhard, J. Pazlarova and K. Demnerova Degradation of polychlorinated biphenyls by hairy root culture of *Solanum nigrum*, *Biotechnology Letters* 19 (1997) 787-790.
- [5] M. Mackova, T. Macek, J. Ocenaskova, J. Burkhard, K. Demnerova and J. Pazlarova Biodegradation of polychlorinated biphenyls by plant cells, *International Biodeterioration & Biodegradation* 39 (1997) 317-325.
- [6] C. Gareis, C. Rivero, I. Schuphan and B. Schmidt Plant-Metabolism of Xenobiotics - Comparison of the Metabolism of 3,4-Dichloroaniline in Soybean Excised Leaves and Soybean Cell-Suspension Cultures, *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 47 (1992) 823-829.
- [7] M. Narayanan, L.C. Davis and L.E. Erickson Fate of Volatile Chlorinated Organic-Compounds in a Laboratory Chamber with Alfalfa Plants, *Environmental Science & Technology* 29 (1995) 2437-2444.
- [8] S.L. Simonich and R.A. Hites Organic Pollutant Accumulation in Vegetation, *Environmental Science & Technology* 29 (1995) 2905-2914.
- [9] M. Inouhe, S. Ninomiya, H. Tohyama, M. Joho and T. Murayama Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono- and dicotyledonous plants, *J. Plant. Res.* 107 (1994) 201-207.

- [10] M. Inouhe, R. Ito, S. Ito, N. Sasada, H. Tohyama and M. Joho Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatins, *Plant Physiol.* 123 (2000) 1029-1036.
- [11] M. Simontacchi, L. Sadovsky and S. Puntarulo Profile of antioxidant content upon developing of *Sorghum bicolor* seeds, *Plant Science* 164 (2003) 709-715.
- [12] E. Morelli, B.H. Cruz, S. Somovigo and G. Scarano Speciation of cadmium - gamma-glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Plant Science* 163 (2002) 807-813.
- [13] O. Demirkol, C. Adams and N. Ercal Biologically important Thiols in various vegetables and fruits, *J. Agr. Food Chem.* 52 (2004) 8151-8154.
- [14] P. Kovacic Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: Electron transfer and oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 2705-2709.

**Poděkování:** Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132 a 1M06030.