



Disertační práce

Chemicko-analytický kontext fytořemediace organických polutantů

Studijní program:

P0588D130006 Environmentální inženýrství

Autor práce:

RNDr. Stanislava Vrchovecká

Školitel práce:

prof. Dr. Ing. Miroslav Černík, CSc.

Ústav nových technologií a aplikované
informatiky

Liberec 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé disertační práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má disertační práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.



Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě podporovali při mém studiu a tvorbě této disertační práce. V první řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu disertační práce panu prof. Dr. Ing. Miroslavu Černíkovi, CSc. a svému konzultantovi Mgr. Pavlu Hrabákovi, PhD., za jejich cenné vedení, odborné rady a trpělivost během celého procesu.

Rovněž bych ráda poděkovala kolegům a kolegyním, přátelům a spolupracovníkům za cenné diskuse, inspiraci a pomoc při zpracování materiálů a sběru dat. Děkuji za sdílení zkušeností a za motivaci pro dokončení studia.

V neposlední řadě patří velké díky mé rodině za trpělivost a podporu během mého studia.



Abstrakt

Předkládaná disertační práce pojednává o fytořemediaci organochlorovaných pesticidů s přednostním využitím olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) a dalších běžných mokřadních druhů - rákos obecný (*Phragmites australis*), sítina rozkladitá (*Juncus effusus*), orobinec širokolistý (*Typha latifolia*). Tato práce je koncipovaná jako soubor čtyř studií, které byly zaměřeny na sledování účinnosti odstranění hexachlorocyklohexanu (HCH) z růstových substrátů, změny v příjmu, akumulaci, distribuci a degradaci HCH prostřednictvím daných rostlinných druhů za měnících se podmínek prostředí. V rámci této práce také byly vyvinuty a optimalizovány analytické metody, které umožnily analýzu rostlinných hormonů, produktů sekundárního metabolismu rostlin a transformačních metabolitů HCH v rostlinné biomase.

Závěry jednotlivých fytořemediačních studií jsou diskutovány v souvislosti s řešenou problematikou a potvrzují, že vybrané rostlinné druhy mají řemediační potenciál pro oblasti kontaminované těmito organochlorovanými pesticidy, přičemž sledování rostlinných hormonů jako stresových markerů nemusí být vhodné z důvodů jejich snadné ovlivnitelnosti. Z experimentálních výsledků dále vyplývá, že účinnost řemediace se odvíjí jak od vlastností samotných rostlin (genetická predispozice, stáří, mechanické seříznutí), tak je dána i charakterem kontaminace (koncentrace chemické látky či její izomerie).

Získaná data a výstupy jsou specifické pro HCH, nelze je generalizovat a jsou nepřenositelné na jiný typ chemické látky. Tato disertační práce může sloužit jako zdroj informací a inspirace při výzkumu fytořemediačních technik s aplikací pro jiné typy polutantů či s využitím rozdílných rostlinných druhů.

Klíčová slova: řemediace, hexachlorocyklohexan, olše lepkavá, fytohormony, LC/HRMS



Abstract

The present dissertation concerns the phytoremediation of organochlorine pesticides, with the preferential use of black alder (*Alnus glutinosa*) and later other common wetland species - *Phragmites australis*, *Juncus effusus*, *Typha latifolia*. This dissertation is designed as a set of four studies that aimed to monitor the removal efficiency of hexachlorocyclohexane (HCH) from growth substrates, changes in uptake, accumulation, distribution and degradation of HCH by the plant species under changing environmental conditions. In this work, analytical methods were also developed and optimized to enable the analysis of plant hormones, plant secondary metabolism products and HCH transformation metabolites in plant biomass.

The conclusions of the individual phytoremediation studies are discussed in the context of the problem at hand and confirm that selected plant species have remediation potential for areas contaminated with these organochlorine pesticides, while monitoring of plant hormones as stress markers may not be appropriate because of their easy influenceability. Experimental results further suggest that the effectiveness of remediation depends on the characteristics of the plants themselves (genetic predisposition, age, mechanical pruning) as well as being determined by the characteristics of the contaminant (chemical concentration or isomerism).

The data and outputs obtained are specific to HCH, cannot be generalized and are not transferable to other types of chemical. However, this dissertation can provide a source of information, methods and inspiration for research on phytoremediation techniques with application to other types of pollutants or using different plant species.

Key words: remediation, hexachlorocyclohexane, black alder, phytohormones, LC/HRMS



Obsah

Obsah.....	6
1. Úvod	12
2. Teoretická část	13
2.1 Fytochemické látky.....	13
2.1.1 Rostlinné hormony	14
2.1.2 Produkty sekundárního metabolismu	19
2.2 Analytické stanovení fytochemických látek.....	21
2.2.1 Stanovení hormonů LC/HRMS cílenou analýzou	21
2.2.2 Necílová analýza pro sledování produktů sekundárního metabolismu	22
2.3 Remediační technologie.....	23
2.3.1 Fytoremediace	24
2.4 Hexachlorocyklohexan (HCH)	27
3. Cíle disertační práce	29
4. Experimentální část, výsledky a diskuze	31
4.1 Analytické metody použité v disertační práci	31
4.1.1 Cílené stanovení vybraných rostlinných hormonů	32
4.1.2 Necílová analýza	38
4.1.3 Stanovení HCH a degradačních produktů.....	39
4.2 Fytoremediace HCH.....	41
4.2.1 Genetická predispozice olše lepkavé pro fytoremediaci a vliv HCH na germinaci a iniciální fáze vývoje rostlin	42
4.2.2 Vliv stárí olše lepkavé a mechanického seříznutí na účinnost fytoremediace ..	49
4.2.3 Rozdíly v účinnosti fytoremediace jednotlivých izomerů HCH	59
4.2.4 Bioakumulace a metabolismus HCH vybranými rostlinnými druhy společně s hodnocením vlivu koncentrace HCH na účinnost fytoremediace.....	66
5. Indikátory hodnocení akumulace a transportu HCH	80
6. Shrnutí disertační práce.....	83
7. Závěr disertační práce	84
8. Další směr vývoje	85
9. Seznam použité literatury	86



Seznam zkratek

$A_{\max}$ (Photosynthetic Capacity) - maximální rychlosti fotosyntézy

ABA (Absciscic Acid) - kyselina abscisová

BCF (Bioconcentration Factor) - biokoncentrační faktor

CE (Collision Energy) - kolizní energie

CIB (Chlorobenzene) - chlorobenzen

CIP (Chlorophenols) - chlorfenoly

DCGP - dichlorfenyl- β -D-glukopyranosid

DDT - Dichlordifenyltrichlorethan

DLLEM (Dispersive Liquid-Liquid Extraction) - disperzní extrakce z kapaliny do kapaliny

DNA (deoxyribonucleic acid) - deoxyribonukleová kyselina

DP (Declustering Potential) - deklasterizační potenciál

GABA (γ -Aminobutyric acid) - γ -aminomáselná kyselina

GAs - gibereliny

GC (Gas Chromatography) - plynová chromatografie

GIB (Gibberellic Acid) - kyselina giberelová

HCH (Hexachlorocyclohexane) - hexachlorocyklohexan

HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) - vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie

IAA (Indole-3-Acetic Acid) - kyselina indol-3-octová

IARC (International Agency for Research on Cancer) - Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

IBA (Indole-3-Butyric Acid) - kyselina indol-3-butyrová

IC (Isochorismate-derived biosynthesis) - izochorismátová cesta biosyntézy

IDA (Information Dependent Acquisition)



JA (Jasmonic Acid) - kyselina jasmonová

JE (Juncus effusus) - sítina rozkladitá

LC/HRMS (Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry) - kapalinová chromatografie s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií

LLE (Liquid-Liquid Extraction) - extrakce z kapaliny do kapaliny

LOD (Limit of Detection) - limit detekce

LOQ (Limit of Quantification) - limit kvantifikace

m/z - poměr hmotnosti a náboje

MCPGM - monochlorfenyl- β -D-(6-O-malonyl) glukopyranosid

MeJA - methylester kyseliny jasmonové

MRM (Multiple Reaction Monitoring) - monitoring vybraných reakcí

MS (Mass Spectrometry) - hmotnostní spektrometrie

OPDA (12-oxo-phytodienoic acid) - 12-oxo-fytodienová kyselina

oxIAA (2-oxindole-3-acetic acid) - 2-oxindol-3-octová kyselina

p.a. (pro analýzu) - stupeň čistoty chemikálií

PA (Phragmites australis) - rákos obecný

PAL (Phenylalanine ammonia-lyase) - fenylalanin amonium lyáza

PCA (Principal component analysis) - analýza primárních komponent

POPs (Persistent Organic Pollutants) - perzistentní organické polutanty

RCF (Root Concentration Factor) - kořenový koncentrační faktor

RPM (Revolutions per Minute) - otáčky za minutu

RSD (Relative Standard Deviation) - relativní směrodatná odchylka

S/N poměr (Signal/Noise Ratio) - poměr signálu k šumu

SA (Salicylic Acid) - kyselina salicylová



SPE (Solid-Phase Extraction) - extrakce na tuhou fázi

SPME (Solid-Phase Microextraction) - mikroextrakce na tuhou fázi

SWATH (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical fragment ions)

TF (Translocation Factor) - translokační faktor

t-HCH (technical-HCH) - technická směs HCH

TL (Typha Latifolia) - orobinec širokolistý

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obrázek 1: Základní struktury hlavních zástupců rostlinných hormonů	19
Obrázek 2: Fytoremediační přístupy, výhody a nevýhody fytoremediace	26
Obrázek 3: Základní struktury stabilních HCH izomerů (Girish a Kunhi 2013).....	27
Obrázek 4: Provedení germinačního (a) a fytoremediačního experimentu (b).....	43
Obrázek 5: Rozdíly v zastoupení sledovaných rostlinných hormonů během germinačního a fytoremediačního experimentu	46
Obrázek 6: Účinnost odstranění (a) a obsah HCH (b) dle jednotlivých potomstev mateřských rostlin daného genotypu.....	47
Obrázek 7: Zahájení experimentu - zasazení jednoletých a dvouletých sazenic a jejich případné seříznutí	50
Obrázek 8: Graf popisující množství rostlinné kořenové (a) a listové (b) biomasy v závislosti na věku rostlin a typu ošetření; dvoucestná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	52
Obrázek 9: Graf remediační účinnosti pro neosázený sediment a jednotlivé skupiny rostlin; b) Obsah HCH v kořenové biomase rostlin u skupin rostoucích v kontaminovaném sedimentu; statistické hodnocení - jednosměrná a dvoucestná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$	53
Obrázek 10: PCA analýza hormonálních výsledků kořenové biomasy	57
Obrázek 11: PCA analýza hormonálních výsledků nadzemní biomasy	57
Obrázek 12 Koncentrace HCH a CIB v jednotlivých rostlinných orgánech a růstovém substrátu pro dané izomery.....	62



Obrázek 13: Vliv HCH na koncentraci fytohormonů v různých částech olše lepkavé: (a) větve, (b) kmen, (c) listy a (d) kořeny; hladina významnosti $\alpha = 0,05$ (znázorněná jako přerušovaná vodorovná linie); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$	63
Obrázek 14: Připravené rostliny v růstovém substrátu před zahájením experimentu	67
Obrázek 15: Celková biomasa pro všechny druhy rostlin a) ošetřené δ -HCH; b) ošetřené t-HCH; JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá; Statistické hodnocení: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p = 0,001$	69
Obrázek 16: Relativní obsah chlorofylu pro všechny druhy rostlin a) ošetřené δ -HCH; b) ošetřené t-HCH; JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá; Statistické hodnocení: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	69
Obrázek 17: Maximální rychlost fotosyntézy za saturačních podmínek pro všechny druhy rostlin a) ošetřené δ -HCH; b) ošetřené t-HCH; JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá; Statistické hodnocení: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	70
Obrázek 18: Účinnost odstranění δ -HCH u všech rostlinných druhů; statistické hodnocení přítomnosti rostlin ve srovnání s neosázenou kontrolou: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$	71
Obrázek 19: Účinnost odstranění δ -HCH u všech rostlinných druhů; statistické hodnocení přítomnosti rostlin ve srovnání s neosázenou kontrolou: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	72
Obrázek 20: Změny výšky píku vybraných flavonoidů u všech rostlinných druhů v závislosti na koncentraci t-HCH.....	77

Tabulka 1: Tabulka vybraných rostlinných hormonů s MS parametry.....	33
Tabulka 2: Výsledky validovaných parametrů - linearita, LOD a LOQ	36
Tabulka 3: Výsledky validovaných parametrů - preciznost a pravdivost	37
Tabulka 4: Výsledky validovaných parametrů - výtěžnost a matriční efekty	38
Tabulka 5: Výsledky sledovaných germinačních parametrů	44
Tabulka 6: Fyzikální konstanty jednotlivých izomerů (ATSDR 2005).....	61
Tabulka 7: Koncentrace δ -HCH a t-HCH v rostlinné biomase	74
Tabulka 8: Hodnoty RCF, TF a BCF pro olši lepkavou.....	81



Tabulka 9: Porovnání rostlinných druhů při expozici δ -HCH.....	82
Tabulka 10: Porovnání rostlinných druhů při expozici t-HCH.....	83



1. Úvod

S rozvojem lidské aktivity v oblasti průmyslu, zemědělství či zdravotnictví, souvisí zvýšená produkce, zpracování, aplikace a skladování chemických látek, jejichž rezidua mohou být následně uvolňována do životního prostředí a způsobovat kontaminaci povrchových i podzemních vod či půd. Toto znečištění představuje potenciální riziko pro exponované organismy - ať už z pohledu akutní či chronické toxicity. Pro sanaci znečištěných oblastí lze využít řadu metod, přičemž v současné době se do popředí dostávají fytoimediační technologie, které představují cenově výhodnější a environmentálně příznivější alternativu ke klasickým remediačním technologiím.

Předmětem této disertační práce je hodnocení potenciálu vybraných rostlinných druhů pro fytoimediační aplikace ve vztahu k organochlorovaným pesticidům. Konkrétně se jedná o hexachlorocyklohexany (HCH), především γ -HCH (lindan), který byl produkován a používán během druhé poloviny minulého století. Pozůstatky těchto činností jsou dodnes dohledatelné (Vijgen et al. 2022) a představují riziko vzhledem k prokázaným negativním zdravotním účinkům (IARC 2015b). Odstraněním těchto POP se zabývá řada prací zaměřených na chemické (Waclawek et al. 2016; 2019) i biologické metody (Boyle et al. 1999). Alternativou k těmto metodám jsou fytoimediační technologie. Bylo prokázáno, že řada rostlinných druhů je schopna akumulovat a degradovat tyto sloučeniny (Becerra-Castro et al. 2013; Balázs et al. 2018). V rámci této práce byla pozornost zaměřena na olši lepkavou (*Alnus glutinosa*) a následně na další běžně využívané mokřadní druhy rostlin (sítina rozkladitá, orobinec širokolistý a rákos obecný).

Cílem této disertační práce je vývoj a optimalizace analytických instrumentálních metod pro stanovení vybraných sloučenin rostlinného metabolismu, které mohou být využity jako markery pro hodnocení fytoimediační účinnosti a pro predikci adaptace rostlin na stresové podmínky a současně pro pozorování změn v příjmu, akumulaci, distribuci a degradaci HCH v různých experimentálních podmínkách. Dílčí výsledky disertační práce byly průběžně publikovány a prezentovány na národních i mezinárodních konferencích. Seznam publikačních výstupů je následně uveden v příloze této práce.



2. Teoretická část

Teoretická část předkládané disertační práce je zaměřena na shrnutí současných poznatků v rámci studované problematiky. Jsou zde uvedeny kapitoly zaměřené na představení vybraných fytochemických látek, konkrétně se jedná o rostlinné hormony a vybrané produkty sekundárního metabolismu rostlin, které mohou sloužit jako možné ukazatele pro hodnocení remediační účinnosti u vybraných rostlinných druhů. Současně je možné tyto ukazatele využít k predikci možné adaptace rostlin na stresové podmínky způsobené přítomností organochlorovaných pesticidů, což může nalézt uplatnění při sledování dlouhodobé udržitelnosti a rentability remediačního systému. Následující kapitola je věnována popisu analytických metod používaných pro kvalitativní i kvantitativní stanovení fytochemických látek. Tato kapitola také obsahuje popis základních principů necílové analýzy využitě pro pozorování změn metabolomu rostlin po expozici organochlorovanými pesticidy a sledování transformačních změn těchto pesticidů. Vzhledem k zaměření této disertační práce na vztah mezi organochlorovanými pesticidy a remediačními technologiemi zde nechybí kapitoly věnující se základním principům a rozdělení remediačních technologií a představení cílového pesticidu - hexachlorocyklohexanu (HCH).

2.1 Fytochemické látky

Fytochemické látky představují sloučeniny rostlinného původu pocházející z primárního i sekundárního metabolismu rostlin (Rabizadeh et al. 2022). Definice primárního a sekundárního metabolismu rostlin není zcela jasná vzhledem k úzkému propojení těchto biologických procesů. Obecně se jako primární metabolismus označují děje podílející se na řízení základních životních procesů rostlin (germinace, růst a diferenciaci rostlin či fotosyntéza) (Baharudin a Osman 2023). Tyto děje jsou nezbytné pro existenci rostliny a z velké části jsou univerzální pro celou rostlinnou říši. Oproti primárnímu metabolismu jsou produkty sekundárního metabolismu strukturně komplexní sloučeniny (fenolické sloučeniny, terpenoidy/izoprenoidy a sloučeniny obsahující dusík nebo síru, kam se řadí alkaloidy či glukosinoláty), které se podílejí na ochraně rostlin před nepříznivými vlivy prostředí. Mohou chránit rostlinu před patogeny, UV zářením, případně mohou sloužit jako atraktanty pro opylovače (Aharoni a Galili 2011).



Zastoupení těchto produktů může být specifické pro daný rostlinný druh, fázi ontogeneze a typ tkáně (Neilson et al. 2013). V první řadě této práce je pozornost zaměřena na rostlinné hormony řadící se svou povahou mezi metabolity primárního metabolismu.

2.1.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony, také známé jako fytohormony, jsou organické nízkomolekulární sloučeniny, které mají úlohu signálních mediátorů. Tyto sloučeniny se podílejí na regulaci základních fyziologických dějů jako je germinace, růst a diferenciacie rostlin či fotosyntéza. Zároveň se také podílejí na zprostředkování reakce způsobené stresovými podněty. Fytohormony jsou účinné při velice nízkých koncentracích (10^{-8} až 10^{-6} M) a jejich účinek je pleiotropní. Hormonální koncentrace je regulována na úrovni syntézy, transportu, dále reverzibilní inaktivací v místě působení nebo degradací. Výsledný efekt v místě působení je podmíněn přítomností, počtem a afinitou specifických receptorů a stavem buňky.

Mezi základní skupiny rostlinných hormonů se řadí auxiny, cytokiny, gibereliny, kyselina abscisová, etylén, jasmonáty, kyselina salicylová a brassinosteroidy (Procházka et al. 1998; Šetlík et al. 2004; Pavlová 2006; Davies 2010; Yamaguchi et al. 2010). Základní struktury hlavních zástupců hormonálních skupin lze nalézt na Obrázku 1. Součástí této disertační práce byl vývoj, optimalizace a validace analytické metody pro stanovení následujících fytohormonů: kyseliny indol-3-octové (IAA) a kyseliny indol-3-butyrové (IBA) jako hlavních zástupců auxinů a kyseliny giberelové (GIB) jako hlavní zástupce giberelinů. Následně byly zvoleny kyseliny jasmonová (JA), salicylová (SA) a abscisová (ABA), které se podílejí na regulaci fyziologických funkcí i stresových reakcí.

Hlavním představitelem auxinů je IAA. Strukturně se jedná o heteroaromatickou organickou kyselinu tvořenou indolovým kruhem, mající slabý pozitivní náboj, a postranním řetězcem tvořeným kyselinou octovou. Díky karboxylové skupině postranního řetězce, vykazuje sloučenina silný negativní náboj při neutrálním pH (Yamaguchi et al. 2010). Strukturním i funkčním analogem k IAA je IBA, která se liší přítomností dvou methylových skupin na postranním řetězci (Woodward a Bartel 2005). IAA je však považována za hlavní růstový mediátor s nejvíce v literatuře dostupnými informacemi týkající se jeho syntézy, metabolismu, funkce i degradace. Syntéza IAA probíhá v semenech, dále v mladých, vyvíjejících se listech a květních orgánech (Procházka et al. 1998). Intenzivní syntéza



probíhá ve vrcholu koleoptile, což je cylindrická struktura chránící vrchol výhonku při průchodu půdou (Procházka et al. 1998; Srivastava 2002). Z této struktury je následně IAA transportován bazipetálně (tedy od vrcholu k bázi) (Procházka et al. 1998). K syntéze IAA de-novo může rostlina využít dvě metabolické dráhy - dráhu závislou nebo dráhu nezávislou na tryptofanu. S ohledem na stádium vývoje a na podmínky prostředí, rostlina může měnit využití drah (Ribnicky et al. 2002; Yamaguchi et al. 2010; Kochhar a Gujral 2020). Cesta nezávislá na tryptofanu je preferována v pozdějších stádiích embryogeneze, kdy kontrola nad nízkými hladinami IAA může být klíčová při vývoji rostliny (Yamaguchi et al. 2010). Tato metabolická dráha vychází z indolu nebo indol-3-glycerol fosfátu (Woodward a Bartel 2005). Dráha závislá na tryptofanu je preferována, pokud jsou vyžadovány vyšší koncentrace IAA (např. při poranění rostliny) (Yamaguchi et al. 2010). Výchozím bodem této dráhy je L-tryptofan. Z této aminokyseliny může syntéza IAA probíhat několika cestami. Indolpyruvátová cesta je nejběžnější cesta syntézy IAA u vyšších rostlin. Dále se jedná o tryptaminovou cestu, indolylacetaldoximovou cestu a indolylacetamidovou cestu syntézy IAA. Poslední zmiňovanou metabolickou cestou disponují mimo rostliny i některé prokaryotické buňky (*Pseudomonas spp.* a *Agrobacterium tumefaciens*) (Procházka et al. 1998; Srivastava 2002; Woodward a Bartel 2005; Koga 1995). Volný IAA představuje aktivní formu auxinu (Zhang a Peer 2017), který je zodpovědný za regulaci řady tropizmů (fototropismus a gravitotropismus), apikální dominanci, stimulaci dlouhivého růstu a dělení buněk, podporu tvorby postranních a adventivních kořenů a účastní se regulace buněčného cyklu (Procházka et al. 1998; Šetlík et al. 2004). Degradace IAA je proveditelná dvěma ireverzibilními oxidačními reakcemi: dekarboxylační a nedekarboxylační (Procházka et al. 1998; Srivastava 2002). Mimo výše uvedené způsoby je IAA snadno degradovatelná v kyselinách nebo pomocí ultrafialového a ionizačního záření (Kochhar a Gujral 2020).

Další významnou skupinou jsou cytokininy. Do skupiny cytokininů se řadí zeatin, nejběžnější a také první identifikovaný cytokinin v rostlinách, dále dihydrozeatin, isopentenyladenin nebo benzyladenin (Nogué et al. 2003; Le Bris 2017). Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou deriváty adeninu s postranním řetězcem na pozici N6. Dle typu substituentu jsou rozlišovány dvě skupiny - izoprenoidní (zeatin, dihydrozeatin) a aromatické cytokininy (benzyladenin). Více častou formou jsou isoprenoidní cytokininy. Tyto sloučeniny mají jako substituent isopentenyl, případně jeho hydroxylovanou formu. V případě aromatických cytokininů je v poloze N6 přítomna benzylová skupina. Výskyt těchto sloučenin v rostlinné tkáni je méně častý, přesto jsou tyto látky používané díky jejich vysoké stabilitě



(nejsou štěpeny cytokinin oxidázou) v tkáňových kulturách (Srivastava 2002; Schmülling 2013). Biosyntéza cytokininů probíhá v nejvyšší míře v apikálním meristému kořene odkud jsou transportovány prostřednictvím xylému společně s molekulami vody a minerálními látkami. Dále k syntéze dochází v místech intenzivního dělení buněk (výhonky, vyvíjející se semena a plody) (Srivastava 2002; Kochhar a Gujral 2020). Funkce cytokininů spočívají ve stimulaci buněčné proliferace, odložení senescence, zpomalení degradace chlorofylu a podpoře v diferenciaci chloroplastů. Dále potlačují apikální dominanci a tvorbu postranních kořenů, čímž fungují jako antagonisté auxinů. Cytokiny mohou být produkovány i patogenními bakteriemi nebo houbami. Příkladem je *A. tumefaciens*, která integrací části své DNA do genomu rostlinné buňky způsobí nadprodukcí cytokininů a nádorovou proliferaci buněk. Cytokiny produkují i dusík vázající symbionti rodu *Rhizobium* (Srivastava 2002; Schmülling 2013; Kochhar a Gujral 2020).

Gibereliny (GAs) představují početnou skupinu rostlinných hormonů, které byly prvně identifikované jako produkt houby *Gibberella fujikuroi* způsobující nadměrný dlouhý růst stonků plodin (Pavlová 2006; Kochhar a Gujral 2020). Tato skupina zahrnuje přibližně 135 sloučenin, přičemž biologicky aktivní je pouze část. Zbylé sloučeniny jsou buď neaktivními konjugáty nebo intermediáty v syntéze. Nejdůležitějšími zástupci jsou GA1 (giberelin), GA3 (kyselina giberelová), GA4, GA7 (Srivastava 2002; Pavlová 2006; Yamaguchi et al. 2010; Davière a Achard 2013). Strukturně se jedná o diterpenoidy, jejichž základní strukturní jednotkou je ent-giberelan. Na základě počtu uhlíků jsou gibereliny rozděleny do dvou skupin: C-20 a C-19 gibereliny. Biologicky účinnější jsou gibereliny skupiny C-19, které mají laktonový kruh. Jednotlivé gibereliny se liší počtem a polohou hydroxylových nebo karboxylových skupin. Jedná se o slabé kyseliny s $pK_a \sim 4,8$. V neutrálním prostředí jsou tedy v disociované formě. Polarita jednotlivých GAs je ovlivněna strukturou, počtem a polohou funkčních skupin a počtem a povahou substituentů (Srivastava 2002). Syntéza GAs probíhá v místech vysoké intenzity proliferace buněk s následným transportem prostřednictvím floému do dalších částí rostlin. Mimo zpětné inhibice je syntéza regulována i vnějšími podmínkami jako je teplota prostředí či světlo (Srivastava 2002). Biologicky aktivní formou jsou volné gibereliny. Konjugací giberelinů s cukry (především s glukózou) vznikají C-6 neaktivní konjugáty. Tyto konjugáty jsou více polární a předpokládá se, že umožňují skladování GAs ve vakuolách a jejich transport floémem na dlouhou vzdálenost. Jsou zde ovšem poznatky, které naznačují, že transportovány mohou být i volné GAs.



Ireverzibilní deaktivace je založená na 2 β -hydroxylaci (Srivastava 2002; Yamaguchi et al. 2010; Kochhar a Gujral 2020). Základní funkcí těchto fytohormonů je stimulace dlouhivého růstu nadzemních částí rostlin. Dále se účastní germinace semen a překonání dormance, kdy přítomnost giberelinů zvyšuje *de novo* syntézu enzymů (α -amyláza, proteinázy) zodpovědných za hydrolýzu zásobních látek a tedy uvolnění energie a stavebních prvků pro potřeby klíčku. Účinky GAs jsou v tomto směru antagonistické k působení ABA, která naopak *de novo* syntézu α -amylázy potlačuje (Procházka et al. 1998; Srivastava 2002; Davière a Achard 2013).

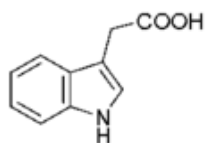
Kyselina abscisová (ABA) je hormonem kontrolující zrání semen a dormanci, růst kořenů a stárnutí listů. Zároveň je také jedním z hlavních stresových hormonů uplatňující se v adaptaci rostlin na nepříznivé environmentální podmínky, jako je nedostatečná vlhkost, nízká teplota či vysoká salinita půdy (Spartz a Gray 2008). Strukturně se ABA řadí mezi seskviterpeny. Díky přítomnosti asymetrického uhlíku (C-1), který vytváří chirální centrum, se ABA může vyskytovat ve formě (S) či (R) (Srivastava 2002; Finkelstein 2013). V rostlinách se vyskytuje pouze S-(+) enantiomer (Srivastava 2002). ABA je syntetizována ve špičkách kořenů, mladých listech, pupenech, hlízách a semenech. K transportu do zbylých částí rostlin je využíváno floému i xylému (Procházka et al. 1998; Kochhar a Gujral 2020). Fyziologické účinky tohoto hormonu zahrnují inhibici prodlužovacího růstu, regulaci dormance pupenů a germinace semen, kdy zabraňuje předčasnému klíčení semen před oddělením od mateřské rostliny. Ke stimulaci klíčení následně dochází po poklesu ABA koncentrace pod hraniční hodnotu. Délka dormance je dána poměrem koncentrace ABA/giberelinů. ABA je také zodpovědná za regulaci vodního režimu a představuje jeden z klíčových stresových hormonů (Procházka et al. 1998; Srivastava 2002; Šetlík et al. 2004). Deaktivace kyseliny abscisové probíhá prostřednictvím oxidační degradace na kyselinu fazeovou a dihydrofazovou (Srivastava 2002).

Jasmonáty představují skupinu odvozenou z metabolismu mastných kyselin a zahrnují především kyselinu jasmonovou (JA), její metylester (MeJA) a isoleucinové konjugáty (Ruan et al. 2019). Tyto sloučeniny se nejen podílejí na regulaci růstu a vývoje rostlin, ale jsou i zařazovány do skupiny stresových hormonů zodpovědných za adaptaci rostlin na abiotické či biotické stresové podněty (Wasternack a Hause 2013). Hlavním představitelem je JA. Její molekula se skládá z cyklopentanového kruhu s postranními řetězci (Miersch et al. 1999; Srivastava 2002; Tamogami et al. 2011).

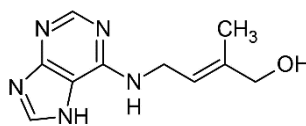


Syntéza JA vychází z α -linolenové nebo oktadekatrienové kyseliny. Tyto kyseliny se mohou vyskytovat volně, případně mohou být uvolněné z membránových glycerolipidů plastidů pomocí fosfolipáz (Srivastava 2002; Kombrink 2012; Wasternack a Hause 2013). Hlavní účinky tohoto fytohormonu spočívají v inhibici germinace semen, růstu kořenů a stárnutí listů. Významnou roli plní JA jako mediátor při stresových reakcích na chlad, nedostatečnou vlhkost, vysokou salinitu prostředí a přítomnost těžkých kovů (Wasternack a Hause 2013; Wang et al. 2020a). Dalším významným dějem je regulace produkce sekundárních metabolitů (Blechert et al. 1995), volatilních organických látek (Boland et al. 1995) zapojených do rostlinných obranných reakcí (Tamogami et al. 2011).

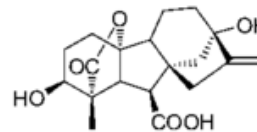
Posledním sledovaným rostlinným hormonem je kyselina salicylová (SA), která je hlavním představitelem skupiny souhrnně nazývané jako salicyláty (Maruri-López et al. 2019). SA je řazena mezi fenolické sloučeniny tvořené aromatickým kruhem s jednou či vícero hydroxylovými skupinami. Strukturně se jedná o 2-hydrobenzoovou kyselinu (Dempsey a Klessig 2017). Přestože byla SA dlouho považována za nevýznamnou sloučeninu sekundárního metabolismu, dnes je pokládána za signální molekulu zodpovědnou za regulaci fyziologických funkcí. Dále hraje zásadní roli v aktivaci a regulaci odpovědi na biotické a abiotické stresy. Uplatňuje se zejména během interakcí rostliny s mikroorganismy jako součást obranného mechanismu (Maruri-López et al. 2019). Syntéza probíhá dvěma cestami - izochorismátovou cestou (IC) a cestou fenylalanin amonium lyázy (PAL). Společné oběma cestám je, že vycházejí z chorismátu a dosud nebyly plně definovány (Dempsey et al. 2011). Význam těchto drah se liší v závislosti na rostlinném druhu - u huseníčku převládá IC cesta, zatímco u rýže cesta PAL (Dempsey a Klessig 2017; Lefevere et al. 2020). Syntetizovaná SA podléhá modifikacím (např. glykosylace), které ve většině případů vedou k biologické inaktivaci. Glykosylovaná forma představuje zásobní formu skladovanou ve vakuolách (Lefevere et al. 2020). Účinek vyvolaný SA je různorodý - ovlivnění klíčení i kvetení, iniciační prvek termogeneze a hlavní mediátor reakce při napadení patogeny (Kochhar a Gujral 2020). Rozhodující roli hraje v případě systémové získané rezistence, což je signální mechanismus poskytující dlouhodobou odolnost vůči sekundárním infekcím v celé rostlině (Gao et al. 2015).



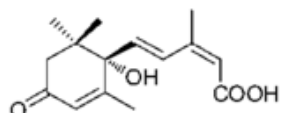
Indol-3-octavá kyselina (auxiny)



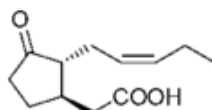
Zeatin (cytokininy)



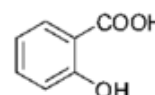
Giberelin GA₁ (gibereliny)



Kyselina abcisová



Kyselina jasmonová (jasmonáty)



Kyselina salicylová (salicyláty)

Obrázek 1: Základní struktury hlavních zástupců rostlinných hormonů

2.1.2 Produkty sekundárního metabolismu

Produkty sekundárního metabolismu rostlin jsou strukturně velice rozmanité sloučeniny, které nemají přímý vliv na základní životní funkce rostlin, ale poskytují výhodu v případě reakce na biotický či abiotický stres (Katam et al. 2022; Wink 2011). Vzhledem k přisedlému způsobu života rostlin je produkce těchto látek mechanismem, který rostlinám umožní reagovat na měnící se podmínky prostředí a přizpůsobit se jim (Carrington et al. 2018). V současnosti jsou popsány desítky tisíc rostlinných sekundárních metabolitů - je známo asi 21 000 alkaloidů, 22 000 terpenoidních látek a 5 000 flavonoidů, přičemž tato čísla nemusí být konečná. Tato chemická rozmanitost koreluje s přítomností genů kódujících enzymy účinkující v sekundárním metabolismu a kvalitativní i kvantitativní profil produktů sekundárního metabolismu je odlišný jak mezi jedinci daného druhu, tak mezi příslušníky odlišných druhů (Kroymann 2011). Jak již bylo řečeno dříve, produkty sekundárního metabolismu lze rozdělit do tří základních skupin - fenolické sloučeniny, terpenoidy/izoprenoidy a sloučeniny obsahující dusík nebo síru. Prekurzory pro tvorbu těchto produktů často pocházejí z primárního metabolismu. Zdrojem těchto prekurzorů je především citrátový cyklus, glykolýza či šikimátová dráha (Wink 2011).



2.1.2.1 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny, také označovány jako polyfenoly, jsou sloučeniny tvořené aromatickým kruhem nesoucím nejméně jednu hydroxylovou skupinu (Saini et al. 2024). Tyto sloučeniny mají řadu pozitivních vlastností na organismus - mají antioxidační účinky a to prostřednictvím inaktivace reaktivních forem kyslíku, indukují aktivitu ochranných enzymů, inhibují peroxidaci lipidů a oxidaci DNA (Chiorcea-Paquim et al. 2020).

Fenolické sloučeniny lze rozdělit do různých skupin podle počtu fenolových kruhů a dle strukturních prvků, které tyto kruhy vážou. Mezi hlavní třídy patří fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. Fenolické kyseliny zahrnují deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové. Přičemž hydroxy deriváty kyseliny skořicové jsou více běžné a mezi hlavní zástupce této skupiny patří kyselina p-kumarová, kávová, ferulová a sinapová.

Další skupinou polyfenolů jsou flavonoidy, které představují rozsáhlou skupinu chemických sloučenin, která je odbornou komunitou nejintenzivněji studována. Základní strukturní jednotka je tvořena dvěma aromatickými kruhy spojenými třemi atomy uhlíky, které tvoří kyslíkatý heterocyklus. Na základě rozdílů způsobený počtem a polohou hydroxylových skupiny, alkylací či glykosylací jsou rozlišovány následující podskupiny: flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly, antokyany a isoflavony. Mezi představitele flavonoidů se řadí např. kvercetin, myricetin a katechiny.

Stilbeny i lignany jsou sloučeniny, které se řadí mezi fytoalexiny, tedy sloučeniny vyskytující se v rostlinném organismu v případě napadení patogenem (Saini et al. 2024; Pandey a Rizvi 2009).

2.1.2.2 Terpenoidy a izoprenoidy

Základní strukturní jednotkou těchto látek jsou pětiuhlíkaté izoprenové jednotky, které mohou polymerizovat. Na základě počtů těchto jednotek jsou následně rozlišovány jednotlivé třídy - hemiterpeny (počet jednotek - 1), monoterpeny (počet jednotek - 2), seskviterpeny (počet jednotek - 3) aj.. Tyto sloučeniny plní funkci éterických olejů nebo insekticidů (Teoh 2015).



2.1.2.3 Dusíkaté látky a sloučeniny s obsahem síry

Nejvýznamnějšími zástupci z této skupiny jsou alkaloidy. Alkaloidy jsou sloučeniny, které ve své struktuře obsahují dusíkatý heterocykl dávající molekulám bazickou povahu. Prekurzorem těchto látek jsou aminokyseliny. Řada těchto produktů sekundárního metabolismu disponují biologickou aktivitou, a tudíž jsou předmětem zájmu farmakologického výzkumu. Mezi zástupce této skupiny patří nikotin, strychnin či morfin (Kotkar et al. 2023; El Sayed 2000; Teoh 2015).

2.2 Analytické stanovení fytochemických látek

2.2.1 Stanovení hormonů LC/HRMS cílenou analýzou

V případě cílové analýzy hormonů jsou používány komerčně dostupné standardy, které jsou použity pro optimalizaci separačních i detekčních podmínek. Pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení fytohormonů se používají separační metody, jako je kapalinová (LC) nebo plynová chromatografie (GC), případně elektromigrační metody s následnou detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

LC/HRMS metoda je v současné době nejrozšířenější a nejrobustnější metoda pro simultánní analýzu rostlinných hormonů. Překážkami asociovanými se stanovením fytohormonů jsou jejich velice nízké koncentrace, nestabilita, různé modifikace a výskyt interferujících látek, které mohou ovlivňovat správné a přesné stanovení, stejně jako citlivost metody (Dobrev et al. 2005; Šimura et al. 2018). V prvním kroku analýzy je podstatná extrakce rostlinného materiálu do příslušného rozpouštědla. Pro tuto extrakci se používají různé směsi vody s organickými rozpouštědly. V řadě případů je nutné nalézt optimální poměr rozpouštědel vzhledem k polaritě cílových látek a koextrakci látek balastních (Du et al. 2012; Šimura et al. 2018). Vyšší procento organického rozpouštědla zaručí dokonalou extrakci cílových látek ovšem současně dojde ke zvýšení obsahu látek nežádoucích jako je například chlorofyl. Kromě obsahu organické složky je žádoucí také zvážit pH extrakčního roztoku vzhledem k možné sensitivitě rostlinných hormonů (Šimura et al. 2018).



I přes optimalizaci extrakčního roztoku, dochází ke koextrakci balastních látek, které by v LC/HRMS analýze způsobily výrazné matriční efekty a mohly by zhoršit separační účinnost chromatografie (Du et al. 2012).

Pro zakoncentrování požadovaných fytohormonů a odstranění látek způsobující interference je využíváno různých metod úpravy vzorků - extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) (Schmelz et al. 2003), extrakce na tuhou fázi (SPE) (Xin et al. 2020; Du et al. 2012; Rolčík et al. 2005) a další modifikace těchto konvenčních metod - mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) (Liu et al. 2007), disperzní extrakce z kapaliny do kapaliny (DLLEM) (Gupta et al. 2011). Nejrozšířenější metodou v hormonální analýze je SPE využívající komerčně dodávané kolonky s C18 modifikovaným silikagelem, případně polymerní sorbenty modifikované funkčními skupinami, které se účastní iontově-výměnného procesu.

Vzhledem k již dříve zmiňované pH sensitivitě některých rostlinných hormonů je upřednostněno používání sorbentu s C18. Nevýhodou SPE procesu je, že často obsahuje řadu evaporačních kroků, které celý protokol časově prodlouží a současně evaporace nemusí být žádoucí především v analýze volatilních či semi-volatilních hormonů (Du et al. 2012; Šimura et al. 2018). Z výše uvedených údajů vyplývá, že výběr optimální metody pro úpravu vzorků je ovlivněn cílovou skupinou látek, maticí a v neposlední řadě také plánovanou analytickou metodou. V rámci experimentální části této disertační práce byla optimalizována a validována LC/HRMS metoda v kombinaci s SPE metodou přípravy vzorků pro stanovení vybraných rostlinných hormonů v rostlinném materiálu.

2.2.2 Necílová analýza pro sledování produktů sekundárního metabolismu

Necílová analýza představuje analytický princip, jehož úkolem je nalézt a případně identifikovat veškeré sloučeniny, které jsou obsaženy ve vzorku. Toto je nesmírně obtížný a časově náročný úkol. V běžné praxi se tedy používá spíše diferenční analýza, při které jsou porovnány profily dvou vzorků, případně dvou skupin vzorků a jsou hledány sloučeniny zodpovědné za jejich významnou rozdílnost. Tento typ analýzy se řadí mezi tzv. metabolomické přístupy, který umožňuje komplexní analýzu metabolomu představující souhrn molekul v daném organismu v určitý čas (Souza et al. 2019; Gevi et al. 2019).



Metabolom představuje fenotypový stav biologického systému, je velice dynamický a ovlivněný vnitřními podmínkami organismu i vnějšími vlivy prostředí. Tento přístup tedy umožňuje zkoumat celkový soubor přítomných látek na molekulární úrovni v reakci například na přítomnost pesticidních látek (Gevi et al. 2019; Katam et al. 2022). Nevýhodou této metody je ovšem nízká citlivost a omezená možnost identifikace metabolitů, jelikož zde, narozdíl od cílené analýzy, je počet komerčně dostupných analytických standardů sekundárních metabolitů velice omezený. Současně rostliny jsou organismy produkující široké spektrum chemicky rozmanitých molekul, jejichž koncentrace se pohybuje v širokém rozsahu, takže zde v současnosti neexistuje analytická metoda schopná zaznamenat veškeré molekuly metabolomu. Přesto je především vysokorozlišující LC/HRMS metoda preferovanou metodou vzhledem k širokému spektru analytů, které lze separovat a detekovat pomocí LC/HRMS systému, vysoké separační účinnosti a vysokému rozlišení metody (Katam et al. 2022; De Vos et al. 2007; Gosetti et al. 2016).

Příprava vzorků pro necílovou analýzu zahrnuje v případě pevných matric pouhou extrakci do rozpouštědla. V případě produktů sekundárního metabolismu se jedná o vodné roztoky s určitým podílem organické složky. Tyto extrakty jsou analyzovány přímo, protože jakákoliv další úprava či derivatizace by mohla způsobit ztrátu některých sloučenin (De Vos et al. 2007). V rámci řešení této práce byla využita metoda diferenční analýzy pomocí LC/HRMS pro sledování a porovnání metabolomu rostlin z kontrolních skupin a skupin ošetřených HCH a pro identifikaci degradačních produktů a konjugátů HCH pocházejících z transformačních procesů.

2.3 Remediační technologie

Rychle se rozvíjející antropogenní činnost spojená se zvýšenou produkcí a použitím chemických látek je jednou z příčin kontaminace životního prostředí, která se projevuje kvalitativními změnami ovzduší, vodního a půdního prostředí (Singh a Ram 2022). Dle schopnosti vyvolávat nepříznivé účinky na exponované organismy jsou tyto kontaminující látky rozděleny na kontaminanty a polutanty. Obě skupiny sdílejí vlastnosti jako jsou perzistence, schopnost bioakumulace a toxicita. Polutanty, narozdíl od kontaminantů, disponují navíc schopností negativně ovlivnit biotu (Hodgson 2010; Chapman 2007).



Polutanty tedy představují sloučeniny, které jsou ve většině případů předmětem remediačního zájmu.

Pro snížení nepříznivých účinků na životní prostředí a obnovu ekosystému se využívají různé sanační technologie. Pokud remediační proces probíhá v místě kontaminace, pak je nazýván *in-situ* procesem. Pokud je odstraňování polutantu prováděno separátně, tedy po odčerpání, odsátí nebo odtěžení znečištěného média, jedná se o remediace *ex-situ* (Gruiz et al. 2019; Mateju 2006). Tyto technologie zahrnují fyzikální, chemické a biologické techniky, případně jejich kombinace (Peng et al. 2018; Mateju 2006), které mohou být uplatněny pro širokou škálu polutantů (Ampofo 2022). Výběr vhodné sanační technologie se odvíjí od řady kritérií. Jedná se o celkovou rentabilitu systému a dlouhodobou i krátkodobou efektivitu systému snížit koncentraci a toxicitu polutantu. Současně se volba typu sanační technologie odvíjí od typu polutantu a vlastností kontaminované oblasti (Dhaliwal et al. 2020). Tato práce se blíže zaměřuje na odstranění pesticidů s využitím fyto remediačních technologií, které mohou být použity jako *in-situ* i *ex-situ* remediační metody.

2.3.1 Fyto remediace

Fyto remediace lze využít pro dekontaminaci znečištěné půdy a dále povrchových i podzemních vod (Vaněk et al. 2017; Arthur et al. 2005). Principem této metody je využití různých rostlinných druhů a jejich asociované rhizosféry mikrobioty k akumulaci, degradaci, inaktivaci či stabilizaci kontaminujících látek anorganického či organického původu. Využití rostlin zde představuje cenově efektivní metodu se snadnou implementací, která je širokou veřejností akceptována (Vaněk et al. 2017). Zároveň tato metoda nenarušuje ekosystém a ráz krajiny ale naopak zvyšuje diverzitu rostlinných druhů a může pomoci chránit půdu proti erozi. Použité rostliny také mohou sloužit jako indikátory remediační úspěšnosti nebo mohou být prostředkem pro monitoring šíření kontaminačního mraku (Vaněk et al. 2017; Arthur et al. 2005; Vangronsveld et al. 2009; Pilon-Smits 2005). Tento typ detekce a monitoringu podpovrchové kontaminace se nazývá fyto screening a jeho hlavní výhodou je snadná proveditelnost a také nízká cena. Principem této metody je příjem kontaminované podzemní vody kořenovým systémem vegetace a její transport transpiračním proudem do nadzemních částí jako kompenzace transpirace rostlin (Burken et al. 2011; Limmer et al. 2011; Ottosen et al. 2018; Sorek et al. 2008).



Podobně jako fytoscreening má použití fytoředivačních technik řadu omezení. V první řadě jsou oba procesy ovlivněny rostlinným druhem a jeho vlastnostmi (morfologie kořenového systému či stáří rostlin), fyzikálně chemickými vlastnostmi kontaminující látky (rozpuštnost, koncentrace, biologická dostupnost, lipofilita), půdním prostředím (obsah organického uhlíku) a environmentálními podmínkami (Vangronsveld et al. 2009; Pilon-Smits 2005). V případě fytoředivace je vhodné, aby rostlina byla rezistentní vůči případné fytoředivě kontaminantu a zároveň, aby byla schopna dlouhodobě růst a prosperovat v jeho přítomnosti. S životními procesy rostliny také souvisí časová náročnost fytoředivace a nebezpečí kumulace kontaminující látky v biomase a její možný přenos do potravinového řetězce. S ohledem na tyto skutečnosti je nutné zvážit fytoředivaci s ohledem na metabolické procesy dané látky v rostlinném organismu (Vaněk et al. 2017; Farraji et al. 2016).

Existuje řada typů fytoředivace, které se rozlišují na základě mechanismů zapojujících se do čištění životního prostředí. Přehled těchto mechanismů je znázorněn na Obrázku 2. Jedná se o rhizofiltraci, rhizodegradaci, fytoakumulaci, fytodegradaci, fytostabilizaci a fytovolatilizaci (Ali et al. 2013). Rhizofiltrace se využívá v hydroponickém či mokřadním systému, kdy se k čištění kontaminované vody využívá především kořenový systém. Uplatňují se zde sorpční procesy či precipitace (Arthur et al. 2005). Kontaminující látka může být po absorpci akumulována v kořenové i nadzemní části rostliny. Rhizodegradace představuje proces, který je využíván především v půdním prostředí a jedná se o metodu s nepřímou účastí rostliny na degradaci dané látky (Arthur et al. 2005; Vaněk et al. 2017; Herath a Vithanage 2015; Vangronsveld et al. 2009). Rostlina v tomto případě stimuluje půdní mikrobiotu k degradaci kontaminující látky prostřednictvím kořenových exudátů, které jsou uvolňovány do prostředí rhizosféry. Tyto exudáty obsahují řadu sloučenin z primárního i sekundárního metabolismu rostlin, které ovlivňují dostupnost a biodegradabilitu polutantů i růst mikroorganismů (Al-Ali et al. 2018). Další fytoředivační procesy, které jsou rozlišovány, jsou fytoakumulace a fytodegradace. Při prvním zmíněném procesu jsou kontaminující látky extrahovány z prostředí a kumulovány především v nadzemní části rostliny, která je následně sklizena a dále zpracována. U fytodegradace dochází po vstupu kontaminantu do vnitřního prostředí rostliny k metabolické degradaci prostřednictvím širokého spektra transformačních procesů, díky kterým je rostlina schopna dané kontaminanty částečně či úplně degradovat (Schwitzguébel et al. 2006).



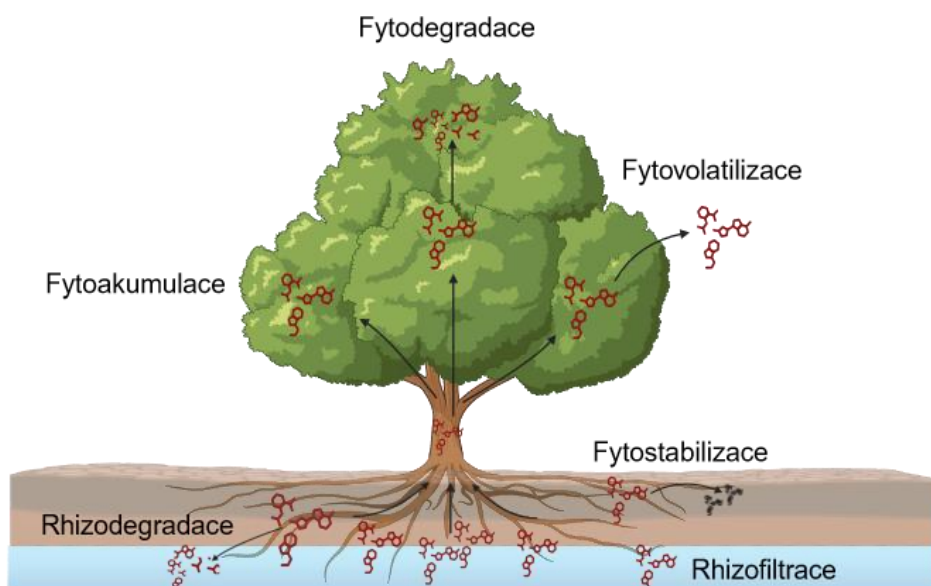
Při fytostabilizaci rostlina vytvoří prostředí omezující šíření kontaminace dále do prostředí, případně redukuje její biologickou dostupnost a toxicitu. Posledním zmiňovaným procesem je fytovolatilizace. Během tohoto procesu dochází vlivem transpirace rostlin k příjmu kontaminantu, jeho transportu a možné biotransformaci s následným uvolněním do atmosféry (Vaněk et al. 2017; Arthur et al. 2005; Vangronsveld et al. 2009; Herath a Vithanage 2015).

Výše uvedené principy lze použít pro řadu kontaminujících látek - těžké kovy (García-Salgado et al. 2012; Zhang et al. 2011; Sakakibara et al. 2011; Ali et al. 2013), výbušné sloučeniny (Kiiskila et al. 2015; Hannink et al. 2002; Panz a Miksch 2012) a pesticidy (Hussain et al. 2009; Moore a Locke 2012; Somtrakoon et al. 2014; Mercado-Borrayo et al. 2015). V rámci této práce byla pozornost věnována organochlorovaným pesticidům a to konkrétně hexachlorocyklohexanu (HCH).

Fytoremediace

Výhody a nevýhody fytoremediačních technologií

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| + Nízká cena a univerzálnost metody | – Časová náročnost |
| + Zvýšení biodiverzity prostředí | – Dostupnost polutantu |
| + Ochrana půd proti erozi | – Fytotoxicita polutantu |
| + In-situ metoda | – Přestup do potravinového řetězce |
| + Akceptace širokou veřejností | – Mezidruhové rozdíly |

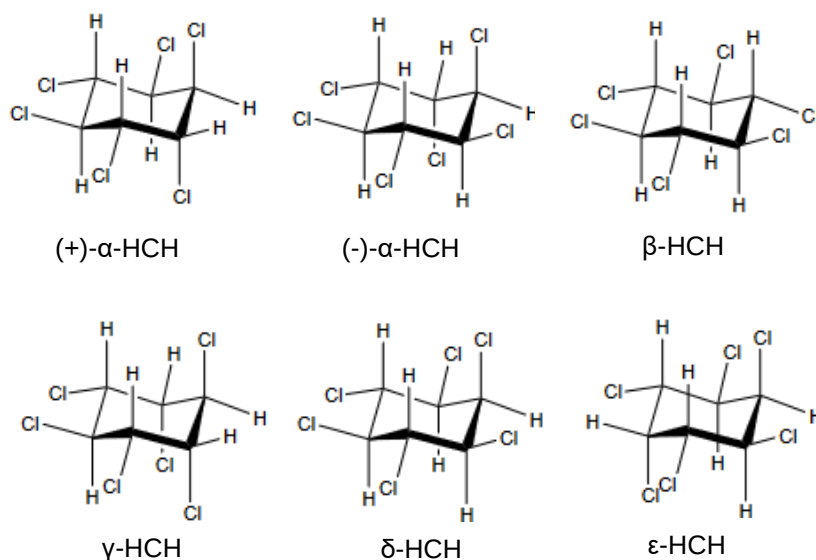


Obrázek 2: Fytoremediační přístupy, výhody a nevýhody fytoremediace



2.4 Hexachlorocyclohexan (HCH)

HCH je pesticid antropogenního původu, který se řadí mezi perzistentní organické polutanty (POPs) (Weber et al. 2013). Na základě prostorového uspořádání atomů chlóru v molekule je rozlišováno 8 různých izomerů označovaných pomocí řecké abecedy (α -HCH až θ -HCH), přičemž α -HCH se může vyskytovat ve dvou enantiomerních formách (Willett et al. 1998). HCH izomery vznikají fotochemickou chlorací benzenu (Walker et al. 1999). Během této reakce vzniká tzv. technická směs HCH, označována jako t-HCH. Tato směs obsahuje izomery v poměru: α -HCH (55-80 %), β -HCH (5-14 %), γ -HCH (8-15 %), δ -HCH (2-16 %) a ϵ -HCH (3-5 %). Ostatní izomery jsou nestabilní nebo se zde vyskytují ve stopovém množství (Willett et al. 1998). Obecně jsou izomery HCH stabilní při působení světla, vysokých teplot či hydrolyze v kyselém či neutrálním prostředí. K jejich zvýšené hydrolyze dochází při vysokém pH (Ngabe et al. 2002). Vzhledem k odlišnému prostorovému uspořádání atomů chlóru v molekule jsou vlastnosti jednotlivých izomerů odlišné. Izomer β -HCH je nejvíce perzistentní a má také vyšší bioakumulační faktor než α -HCH a γ -HCH, což je dáno umístěním atomů chlóru v ekvatoriální pozici (Willett et al. 1998).



Obrázek 3: Základní struktury stabilních HCH izomerů (Buser a Mueller 1995)



Mezi lety 1940 až 1950 byl t-HCH používán jako levný insekticid. Aplikací této směsi ovšem docházelo k ovlivnění organoleptických vlastností ošetřených plodin a zároveň požadovaný pesticidní efekt vykazoval pouze γ -HCH (Vijgen et al. 2011). Z tohoto důvodu byl γ -HCH izolován z t-HCH pomocí metanolu nebo kyseliny octové s následnou frakční rekrytalizací. Takto byl získán γ -HCH v čistotě 99.9 %, komerčně označován jako lindan (Willett et al. 1998). Během produkce lindanu tedy vzniká vysoké procento ostatních izomerů, které jsou považovány za vedlejší/odpadní produkty výroby (Willett et al. 1998; Walker et al. 1999; Vijgen et al. 2011).

Toxický účinek HCH spočívá v působení na centrální nervovou soustavu, i když přesný mechanismus není znám, předpokládá se ovlivnění neurotransmise zprostředkovanou γ -aminomáselnou kyselinou (GABA). Dalšími účinky pozorovanými při působení HCH je poškození ledvin, jater, krevního obrazu (Willett et al. 1998) a narušení reprodukčních funkcí (Khan et al. 2010). Předpokládáné jsou i vlastnosti endokrinních disruptorů (Willett et al. 1998; Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila v roce 1987 HCH do skupiny B2 - pravděpodobně karcinogenní pro člověka (IARC 1987). Lindan byl v roce 2015 překlasifikován jako karcinogen (IARC 2015a). Lindan společně s α -HCH a β -HCH byly zahrnuty v roce 2009 do skupiny POPs Stockholmské úmluvy a to s ohledem na bioakumulační a perzistentní vlastnosti a schopnosti migrace na dlouhé vzdálenosti (Stockholm Convention 2019). Současně jsou HCH detekovatelné ve všech složkách životního prostředí (Walker et al. 1999; Vijgen et al. 2005). Přestože již byla výroba HCH ve světě omezena nebo zakázána (Vijgen et al. 2011), všeobecné používání, nesprávná manipulace, nekontrolovatelné skládkování a odolnost vůči fyzikálně-chemické a biologické degradaci vedly k rozsáhlé kontaminaci životního prostředí (Abhilash a Singh 2009; Weber et al. 2013; Calvelo Pereira et al. 2010). K roku 2022 je celosvětově evidováno téměř 300 míst (bývalé výrobní a zpracovatelské podniky, nezabezpečené skládky, sklady a úložiště), kde je uskladněno odhadem 4,8 - 7,4 milionů tun HCH odpadu (Vijgen et al. 2022). Sekundární rizikovost HCH je dána také jejich schopností transformace na vysoce toxické dibenzodioxiny při nedokonalém spalování (Weber a Kuch 2003).



HCH mohou být z ekosystémů odstraňovány s využitím fyzikálních, chemických i biologických metod (Dong et al. 2015). Jedním z možných nástrojů pro odstranění či snížení HCH kontaminace či detekci šíření kontaminačního mraku je fyto remediac e a fytoscreening. Pro tyto účely byly zkoušeny různé rostlinné druhy - *Phragmites australis* (Faure et al. 2012), *Acacia nilotica*, *Brassica juncea*, *Vicia faba*, *Triticum aestivum* (Wu et al. 2019), *Triticum sp.* (Liu et al. 2021) nebo *Eucalyptus dunnii* (Gotelli et al. 2020) u kterých byl hodnocen potenciál pro využití v oblasti remediac e znečištění těmito organochlorovanými látkami.

3. Cíle disertační práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo hodnocení potenciálu vybraných rostlinných druhů v kontextu fyto remediac e HCH a to prostřednictvím experimentů sledujících vlastnosti rostlin či kontaminace, které mohou ovlivnit rentabilitu a účinnost fyto remediac e systému, a sledování produktů primárního či sekundárního metabolismu rostlin s cílem nalézt vhodné sloučeniny umožňující predikovat adaptaci vybraných rostlin na přítomnost chemické látky. V této disertační práci je pozornost věnována především olši lepkavé (*Alnus glutinosa*). Tímto zaměřením tato práce vyplňuje určitou mezeru ve fyto remediac e výzkumech, které se především zaměřují na rychlerostoucí rostliny jako je vrba, topol, paulovnie nebo ozdobnice. Olše lepkavá není první volbou při fyto remediac e a současně je zde omezené množství dostupných informací týkající se jejího vztahu s polutanty. Přesto však disponuje vlastnostmi, které ji činí možným kandidátem pro remediac e účely. Olše lepkavá představuje rychle rostoucí strom tvořící podstatnou součást břehových ekosystémů, kde plní ekologickou i mechanickou funkci. Jejími dalšími výhodnými vlastnostmi je schopnost růst na nutričně chudých substrátech a schopnost odolat širokému rozmezí teplot (Claessens et al. 2010). Současně je olše dlouhodobě studována z důvodu jejího využití v oblasti fytoscreeningu a tedy možného aplikačního rozšíření poznatků do oblasti detekce a monitoringu šíření kontaminace podzemních vod (Hrabák et al. 2018). Následně byla pozornost věnována vybraným mokřadním rostlinám (rákos obecný - *Phragmites australis*, sítina rozkladitá - *Juncus effusus*, orobinec širokolistý - *Typha latifolia*), které tvoří důležitou součást mokřadních systémů. Tyto vybrané druhy patří do skupiny emerzních rostlin, pro které je charakteristické zakořenění v půdě a přítomnost fotosyntetických orgánů nad vodní hladinou (Herath a Vithanage 2015).



Hlavními funkcemi těchto rostlin v mokřadním systému patří stabilizace podloží, filtrace, poskytnutí povrchu pro uchycení a růst mikroorganismů (Herath a Vithanage 2015), příjem látek a uvolnění kyslíku z kořenů do oblasti rhizosféry (Brix 1994). Mokřadní rostliny mají pro fytoremediaci HCH speciální relevanci hlavně díky tomu, že typické HCH lokality jsou situovány v terénních depresích (staré pískovny, lomy, důlní odvaly, brownfields) v bezprostředním kontaktu s podzemní či povrchovou vodou.

Dílčím cílem předkládané disertační práce byl vývoj analytických metod pro stanovení primárních i sekundárních metabolitů rostlinného metabolismu v rostlinné tkáni. Tato práce si kladla za cíl vyvinout, optimalizovat a případně validovat analytické metody pro získání precizních a pravdivých výsledků. Tyto metody byly následně použity pro analýzu reálných vzorků pocházejících z experimentální činnosti. V první řadě byly sledovány rostlinné hormony prostřednictvím cílové analýzy, později byla pozornost věnována analýzám metabolomu prostřednictvím necílové analýzy. Byly hodnoceny jak kvalitativní, tak kvantitativní změny těchto sloučenin způsobené přítomností organochlorovaného pesticidu. Dílčím cílem této práce bylo i sledování osudu HCH v rostlinné biomase, tedy příjem HCH kořenovým systémem, jeho akumulace, distribuce v jednotlivých rostlinných orgánech či možné transformační přeměny této parentní látky.



4. Experimentální část, výsledky a diskuze

Experimentální část předkládané disertační práce je rozdělena do dvou oblastí. První oblast se věnuje analytickým metodám, které byly použity v rámci řešení disertační práce. Konkrétně je zde popsán postup optimalizace a validace analytické LC/HRMS metody pro cílové stanovení vybraných rostlinných hormonů. Tento proces zahrnuje optimalizaci parametrů pro hmotnostní spektrometrii, optimalizaci separačních podmínek, optimalizaci přípravy vzorku a validaci metody. Dále jsou v této kapitole představeny metody necílové LC/HRMS analýzy, které byly použity pro sledování změn v sekundárním metabolismu rostlin po aplikaci polutantu a také pro hledání nových transformačních produktů HCH. V neposlední řadě zde je popsána cílová metoda využívající GC/MS systém pro cílovou analýzu HCH a chlorobenzenů (CIB).

Druhá část experimentální práce je zaměřena na popis jednotlivých fytořediačních experimentů, které byly provedeny s cílem hodnotit vztah mezi HCH a cílovými druhy rostlin za různých experimentálních podmínek. Tato část popisuje cíle a design experimentů, zpracování, analýzu a vyhodnocení reálných vzorků a hodnotí získané poznatky v kontextu fytořediace.

4.1 Analytické metody použité v disertační práci

V rámci řešení tématu disertační práce byly využity chromatografické metody s odlišnými přístupy. Pro analýzu rostlinných hormonů byla využita kapalinová chromatografie s vysokorozlišující hmotnostní detekcí (LC/HRMS). V tomto případě byla optimalizována a validována metoda pro cílené stanovení kvalitativních i kvantitativních změn vybraných hormonů v rostlinné tkáni po expozici HCH. Analýza změn sekundárního metabolismu byla provedena také metodou LC/HRMS s využitím necíleného přístupu. Zavedená metoda využívající plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí (GC/MS) byla použita pro stanovení HCH a CIB.



4.1.1 Cílené stanovení vybraných rostlinných hormonů

4.1.1.1 *Použité chemikálie a přístrojové zařízení*

Standards fytohormonů - kyselina indol-3-octová (IAA), kyselina indol-3-butyrová (IBA), kyselina gibberelová (GIB), kyselina jasmonová (JA), salicylová (SA) a abscisová (ABA) byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Izotopicky značená IAA a ABA byly pořízeny od dodavatele Olchemin s.r.o. (Olomouc, CZE). Metanol HPLC čistoty a LC-MS čistoty byly dodány firmou Merck (Burlington, Massachusetts, USA). Kyselina mravenčí (HCOOH) LC-MS čistoty byla zakoupena od firmy Fischer Chemical (Hampton, New Hampshire, USA). SPE kolonky Oasis HLB byly dodány společností Waters (Milford, Massachusetts, USA). Demineralizovaná voda byla získána z purifikačního přístroje Puranity TU6 UV+ od společnosti VWR International s.r.o. (Radnor, Pensylvánie, USA). Analýza probíhala na ExionLC systému s následnou detekcí pomocí hmotnostního spektrometru X500R QTOF s iontovým zdrojem Turbo V, vše od společnosti AB Sciex.

4.1.1.2 *Optimalizace MS parametrů, LC separace a přípravy vzorků, validace metody*

V rámci optimalizace jednotlivých kroků byla pozornost zaměřena na získání optimálních podmínek pro kvalitativní a kvantitativní stanovení vybraných fytohormonů v rostlinné matici. Pro optimalizaci byly připraveny zásobní roztoky standardů v metanolu o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, které byly následně ředěny 1% kyselinou mravenčí na požadované koncentrace. Během vývoje metody byla pozornost věnována optimalizaci m/z přechodů jednotlivých analytů, dále byl zkoumán vliv mobilní fáze na separaci analytů a intenzitu detekce, SPE proces a to především objem vzorku aplikovaného na SPE kolonky a objem elučního rozpouštědla. V rámci validace metody byla pro každý sledovaný analyt sestavena kalibrační přímka, byl určen lineární rozsah, stanoven limit detekce a kvantifikace (LOD a LOQ), pravdivost a preciznost metody prostřednictvím opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti, výtěžnost a matriční efekty (Suchánek a Milde 2013).



4.1.1.3 Výsledky optimalizace MS parametrů

Pro každý výše uvedený rostlinný hormon byl připraven roztok v čistém metanolu, který byl použit pro full scan prekurzorových iontů v negativním i pozitivním ionizačním módu. Vyšší intenzity signálu pro většinu iontů prekurzorů bylo dosaženo při použití módu negativního. Následně byla provedena fragmentace prekurzorového iontu se záznamem produktových iontů. Pro každý analyt byly vybrány dva specifické přechody, které byly monitorovány v MRM (multiple reaction monitoring) módu pro identifikaci a kvantifikaci analytů. Posledním krokem byla optimalizace deklasterizačního potenciálu (DP) a kolizní energie (CE) pro každý analyt a přechod. Optimální parametry DP a CE pro dané analyty jsou uvedeny v Tabulce č. 1. Optimalizované parametry následně zahrnovaly: napětí na kapiláře elektrospreje (-4500 V), teplotu zdroje (400 °C), Curtain gas (241 kPa), Ion source gas 1 (276 kPa), Ion source gas 2 (345 kPa).

Tabulka 1: Tabulka vybraných rostlinných hormonů s MS parametry

Cílová látka	MRM přechod (m/z)	Deklasterizační potenciál (V)	Kolizní energie (V)
IAA	174 → 130	-50	-10
	174 → 128	-45	-10
IBA	202 → 116	-40	-15
	202 → 158	-40	-70
GIB	345 → 143	-40	-30
	345 → 239	-40	-15
JA	209 → 59	-75	-15
	209 → 109	-75	-20
SA	137 → 93	-40	-15
	137 → 65	-50	-35
ABA	263 → 153	-75	-10
	263 → 204	-40	-25
D-IAA	179 → 135	-50	-10
2H-ABA	269 → 159	-75	-10

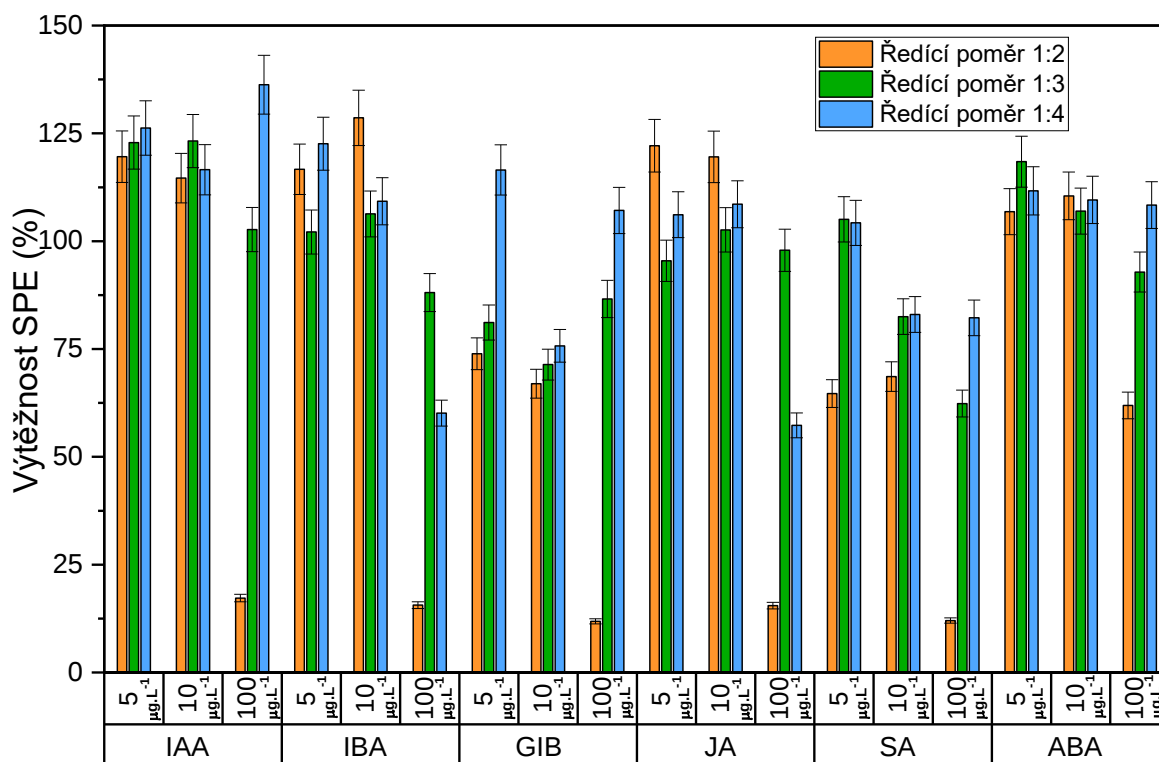


4.1.1.4 Výsledky optimalizace LC separace

Na základě literatury se pro separaci fytohormonů běžně používá stacionární fáze C18 (Segarra et al. 2006; Scalabrin et al. 2016; Yalcin et al. 2019; Perin et al. 2018; Šimura et al. 2018). Pro separaci rostlinných hormonů byla tedy zvolena dostupná kolona Kinetex Evo C18 (100 mm; 2,1 mm; 2,6 μ m; Phenomenex). Složení mobilní fáze bylo optimalizováno s ohledem na její vliv na ionizaci analytů (Cho et al. 2013). Vodná mobilní fáze obsahující 0,1% kyselinu mravenčí poskytla nejlepší odezvu i poměr signálu látek vůči šumu základní linie. Vyšší obsah kyseliny mravenčí neměl vliv na separační podmínky, ale intenzita signálu pro fytohormony byla snížena. Úprava pH na často používanou hodnotu 3,5 přidáním mravenčanu amonného vedla k posunu retenčních časů a zároveň k potlačení odezvy detektoru. Pro separaci byla zvolena gradientová eluce začínající na 5 % metanolu s postupným nárůstem organické složky na 50 % během prvních 5 minut analýzy. Toto složení mobilní fáze bylo zachováno po dobu 2 minut s následným opětovným poklesem na počáteční koncentraci metanolu. K separaci fytohormonů docházelo během 9,5 minut s průtokem 0,3 ml·min⁻¹. Teplota kolonového kompartmentu byla nastavena na 40 °C. Nastříkované množství vzorku bylo 10 μ l.

4.1.1.5 Výsledky optimalizace přípravy vzorku

Přečištění vzorků s cílem odstranit interferující sloučeniny a zakoncentrovat fytohormony je nezbytnou součástí analytického procesu. Příprava vzorků zahrnuje extrakci hormonů z rostlinné matrice do vhodného extrakčního roztoku s následnou SPE. SPE je základní metodou, která je používána v široké škále aplikací pro zakoncentrování požadovaných látek a přečištění extraktů. Základní postup SPE zahrnuje kondicionaci, aplikaci vzorku, promytí a následnou eluci (Simpson 2000). Pro extrakci byl zvolen 50% metanol, který byl nadávkován k 50 mg rostlinné matrice. Extrakce probíhala po dobu 30 minut na horizontální třepačce při 300 rpm s následnou SPE s využitím Oasis HLB kolonek. Extrakční rozpouštědlo, množství rostlinného materiálu a typ SPE kolonek byl zvolen na základě rešerše odborné literatury, kde je poukázáno na zvýšené matriční efekty při použití vyššího obsahu organických rozpouštědel, možné snížení výtěžnosti SPE procesu při použití vyššího množství rostlinné matrice a vhodnost použití Oasis HLB kolonek (Šimura et al. 2018).



Obrázek 4: Procentuální výtěžnost SPE pro vybrané fytohormony ve třech různých koncentracích (5, 10 a 100 µg·L⁻¹) při různém obsahu organického rozpouštědla

Optimalizován byl poměr ředění extraktu pomocí 1% kyseliny mravenčí a to z důvodů vynechání odpaření extrakčního rozpouštědla. Důvodem byla úspora času, minimalizace ztrát během přípravy a zvýšení retence fytohormonů na HLB kolonkách. Dále byly vyzkoušené následující poměry extraktu a vodného roztoku 1% kyseliny mravenčí: 1:2, 1:3 a 1:4 (v/v). Optimalizace probíhala na třech koncentračních hladinách hormonů - 5, 10 a 100 µg·L⁻¹ metodou výtěžnosti. Výsledky výtěžnosti (Obrázek 4) ukazují, že vysoký obsah organického rozpouštědla při nanášení vzorku má ve většině případů negativní efekt na výtěžnost SPE procesu především u vysokých koncentrací cílových látek. Nízké výtěžnosti byly také zaznamenány u GIB, který je ovšem podstatně chemicky odlišný od zbývajících látek. Vzhledem k procentuálním hodnotám výtěžnosti SPE procesu, je optimální ředění vodným roztokem obsahující kyselinu mravenčí na poměr 1:3 či 1:4. Pro další analýzy byl následně zvolen poměr 1:3,5.



Dalším krokem byla optimalizace objemu elučního rozpouštědla (2 - 4 ml) s důrazem na vysokou výtěžnost analytu a nízké matriční efekty. Pro eluci bylo dostačující použití 2 ml čistého metanolu, přičemž další objemové navýšení vedlo pouze ke zvýšené eluci balastních látek se zanedbatelným pozitivním efektem na výtěžnost. Finální metoda přípravy vzorků pro analýzu zahrnovala výše popsanou extrakci fytohormonů do 50% metanolu, následné ředění roztokem 1% kyseliny mravenčí v poměru 1:3,5. Následovala SPE procedura, která se skládala z kondicionace kolonek pomocí 1 ml čistého metanolu, 1 ml 1% kyseliny mravenčí a 1 ml 10% metanolu s 1 % kyseliny mravenčí. Dalšími kroky byly aplikace vzorku, promytí 1 ml 1% kyseliny mravenčí, eluce 2 ml čistého metanolu, odpaření vzorku při 40 °C pod proudem N₂ a rekonstituce v mobilní fázi.

4.1.1.6 Validace metody

Po optimalizaci LC/HRMS metody byla provedena validace s cílem ověřit vhodnost metody pro zamýšlené využití. Mezi validovanými parametry byla linearita, LOD a LOQ, pravdivost, preciznost, výtěžnost a matriční efekty. Linearita byla stanovena pomocí kalibrační závislosti metodou lineární regrese měřeními tří sad kalibračních roztoků standardů. LOD a LOQ byly stanoveny pomocí kalibrační křivky, přičemž LOD je hodnota trojnásobku poměru signálu k šumu (S/N poměr). LOQ představuje nejnižší bod kalibrační křivky a zároveň splňuje podmínku 10*S/N. Získané rovnice kalibračních přímk, rozsah a hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Výsledky validovaných parametrů - linearita, LOD a LOQ

Analyt	Rovnice kalibračních přímk	R ²	Rozsah (μg·L ⁻¹)	LOD (μg·L ⁻¹)	LOQ (μg·L ⁻¹)
IAA	y = 0,0108x - 0,0008	0,9996	0,66 - 200	0,22	0,66
IBA	y = 0,0228x - 0,0342	0,9995	2,49 - 200	0,83	2,49
GIB	y = 0,0137x - 0,0092	0,9998	0,75 - 200	0,25	0,75
JA	y = 0,2718x - 0,0588	0,9997	0,27 - 50	0,09	0,27
SA	y = 0,1256x + 0,1271	0,9993	0,84 - 50	0,28	0,84
ABA	y = 0,1753x - 0,0445	0,9997	0,12 - 200	0,04	0,12



Preciznost (vyjádřena jako RSD (%)) a pravdivost (vyjádřena jako bias (%)) metody byly stanoveny opakovaným měřením ($n=5$) standartních roztoků za podmínek opakovatelnosti v rámci jednoho dne (intra-day) a mezilehlé preciznosti (inter-day) během tří po sobě jdoucích dnů (počet nástřiků = 3). Měření bylo provedeno na třech koncentračních hladinách - 5, 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. V rámci intra-day preciznosti a pravdivosti byly hodnoty RSD v rozmezí 0,01 až 4,59 % a hodnoty bias v rozsahu od -4,79 do 4,19 %. Rozsah RSD v případě inter-day preciznosti byl od 1,64 do 9,71 % a hodnoty bias se pohybovaly od -9,26 do 6,93 % (Tabulka 3).

Tabulka 3: Výsledky validovaných parametrů - preciznost a pravdivost

Analyt	Koncentrace standardu ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Intra-day		Inter-day	
		Preciznost, RSD (%)	Pravdivost, bias (%)	Preciznost, RSD (%)	Pravdivost, bias (%)
IAA	5; 10; 100	2,66; 3,68; 3,85	-0,36; 1,04; 0,22	6,44; 6,46; 9,41	2,12; -3,63; -6,73
IBA	5; 10; 100	0,96; 2,01; 3,35	2,03; 3,93; -4,79	1,64; 3,77; 2,95	6,93; 0,15; -2,01
GIB	5; 10; 100	3,51; 2,11; 2,32	4,19; -1,49; -1,64	7,44; 6,88; 5,12	3,60; 4,01; -9,26
JA	5; 10; 100	2,47; 0,67; 2,49	-0,87; 1,69; 2,61	9,71; 9,53; 9,54	-5,27; -7,53; -7,93
SA	5; 10; 100	2,62; 0,01; 1,65	-1,11; 4,45; -1,48	3,34; 2,86; 4,41	-6,37; -9,20; -8,89
ABA	5; 10; 100	4,59; 3,93; 2,81	-1,64; 0,48; 0,77	7,78; 8,13; 8,61	-3,10; -9,10; -7,32

Výtěžnost a matriční efekty byly stanoveny individuálně pro listovou a kořenovou matici. Jako modelová rostlina byla zvolena olše lepkavá, která byla následně použita při reálných fytoimediačních aplikacích. Stanovení výtěžnosti bylo provedeno v triplicátech příslušné rostlinné matrice, která byla před purifikací obohacena o neznámé standardy rostlinných hormonů na třech koncentračních hladinách, tak aby konečná koncentrace analytů byla 5, 20 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Vzhledem k nemožnosti získat matici bez cílových látek, byla v triplicátu zpracována a analyzována i matrice pro stanovení aktuální koncentrace hormonů v rostlině. Tato koncentrace byla následně odečtena od koncentrací zjištěných po obohacení. Výtěžnost celého procesu byla vypočítána jako poměr koncentrací obohacené a extrahované matrice k matici extrahované s následným obohacením fytohormony. Získané výsledky se



pohybují v rozmezí od 70 - 113 % (Tabulka 4). Stanovení matričních efektů bylo provedeno pomocí směrnice kalibračních křivek analytů v čistém rozpouštědle a matici. Z výsledků je patrné, že SPE úprava je vhodná více pro kořenový systém než pro listovou biomasu. Z důvodů vysokých matričních efektů je v analýze používáno izotopicky značených standardů.

Tabulka 4: Výsledky validovaných parametrů - výtěžnost a matriční efekty

Analyt	Výtěžnost listy (%)	Výtěžnost kořeny (%)	Matriční efekty listy (%)	Matriční efekty kořeny (%)
IAA	89,85; 81,39; 78,63	70,36; 73,93; 70,35	-79,57	-76,30
IBA	73,88; 71,50; 70,25	89,28; 88,75; 81,60	-80,55	-72,48
GIB	82,26; 78,61; 102,34	79,91; 94,38; 76,55	-77,01	-62,60
JA	112,48; 103,74; 108,99	102,36; 92,35; 104,67	-66,74	-48,34
SA	89,86; 81,39; 78,63	62,54; 75,27; 75,89	-98,19	-98,17
ABA	85,59; 82,87; 81,29	75,53; 71,61; 80,09	-78,68	-63,66

4.1.1.7 Shrnutí

V první části disertační práce byla optimalizována a validována metoda pro stanovení vybraných rostlinných hormonů v rostlinném materiálu olše lepkavé. Optimalizované byly vybrané parametry týkající se přípravy vzorku, separace fytohormonů a jejich detekce. Následná validace ukázala vhodnost metody pro výše zmíněný účel s využitím izotopicky značených standardů pro korekci matričních efektů.

4.1.2 Necílová analýza

4.1.2.1 Použité chemikálie, zpracování vzorků a přístrojové zařízení

Použité chemikálie byly obdobné jako v případě analýzy rostlinných hormonů. Jednalo se o demineralizovanou vodu, metanol a kyselinu mravenčí. Všechny použité chemikálie byly LC/MS čistoty. Vzorky rostlinné biomasy byly rozemlety na prášek v přítomnosti tekutého dusíku.



Takto připravený materiál byl následně navážen do vialek a extrahován směsí obsahující metanol a vodu (8:2, v/v). Nižší zastoupení metanolu může mít za následek nedostatečnou extrakci cílových sloučenin a naopak použití čistého metanolu zapříčiní účinnou extrakci chlorofylu, který se v rostlinné tkáni vyskytuje ve vysoké koncentraci a mohl by ovlivnit detekci ostatních organických sloučenin. Po extrakci byl vzorek zcentrifugován (10 min.; 4000 rpm) a následně byl odebrán supernatant, který byl analyzován.

Necílená analýza byla provedena na identickém přístroji jako analýza rostlinných hormonů. Separace analytů probíhala na analytické koloně YMC-Triart C18 (100 x 2.1 mm I. D.; 3 μ m; YMC CO. JPN) s využitím gradientové eluce. Mobilní fáze byl tvořena organickou (metanol) a vodnou složkou (0,1 % kyselina mravenčí). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,42 ml·min⁻¹, teplota kolonového kompartmentu byla 40 °C a nastříkovaný objem vzorku byl 20 μ L. Měření vzorků probíhalo v pozitivním i negativním módu s cílem zachytit široké spektrum analytů. Rozsah sledovaných hodnot m/z byl v TOF/MS módu v rozmezí od 90-900 m/z s akumulacním časem 0,1 s. Napětí na sprejovací kapiláře bylo v případě pozitivního módu nastaveno na 5 500 V a -4 500 V pro negativní mód. Všechny vzorky rostlinné biomasy byly analyzovány pomocí akvizice IDA (Information dependent acquisition) a SWATH (software Analytics, AB Sciex, MA, USA). Akvizice IDA umožňuje získat kvalitnější spektra pro následnou identifikaci pomocí dostupných knihoven (Natural Products HR-MS/MS 2.0, NIST 2017, AB Sciex, MA, USA). Analýza pomocí akvizice SWATH umožňuje sběr dat pro provedení fragmentace všech sloučenin ve vzorku. Tato data byla použita k vyhledání teoretických metabolitů a jejich fragmentačních spekter.

4.1.3 Stanovení HCH a degradačních produktů

4.1.3.1 Použité chemikálie, zpracování vzorků a přístrojové zařízení

Použité chemikálie pro kvantifikaci HCH a CIB zahrnovaly rozpouštědla p.a. čistoty a potřebné analytické standardy. Pro nastavení metody a vytvoření kalibračních řad byly použité komerčně dostupné standardy s označením Chlorobenzene - Mix 12 (Neochema, GER) a Pesticides - Mix 5 (Neochema, GER).



Jako interní standardy pro korekci matričních efektů a fluktuaci účinnosti ionizace byl využit izotopicky značený 1,3,5-triCIB D3 (LGC Standards, USA) pro kvantifikace CIB a deuterovaný γ -HCH D6 (LGC Standards, USA) pro kvantifikaci HCH. Dále byly použity rozpouštědla aceton a hexan zakoupeny od společnosti Lach-ner s.r.o. (CZE) a bezvodý síran sodný (Penta Chemicals Unlimited, CZE).

Zpracování vzorků zahrnuje namletí vzorků na jemný prášek a navážení příslušného množství do skleněné vialky. V případě analýzy zemin je přímo naváženo určité množství zhomogenizovaného vzorku do příslušné vialky. Následuje extrakce směsí aceton:hexan (1:1; v/v) po dobu 24 h na horizontální třepačce (300 rpm) při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby je odebrána organická složka, která je zbavena zbytkové vodné složky pomocí bezvodého síranu sodného. Takto připravený vzorek je následně analyzován na soustavě GC/MS.

Soustava GC/MS je tvořena plynovým chromatografem Trace 1310 s autosamplerem PAL RTC a hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupólu TSQ8000 Evo (Thermo Fisher Scientific Inc., MS, USA). Pro separaci analytů je použita chromatografická kolona Restek Rxi-5ms (30 m, 0,25 i.d. s tloušťkou filmu 0,25 μm). Jako mobilní fáze je v této analýze použito helium s teplotním gradientem. V této analýze je použita metoda kapalného nástřiku, kdy objem vzorku činí 1 μL . Analýzou kalibračních roztoků byly stanoveny LOD ($0,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) i LOQ ($2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pro vzorky rostlin i zeminy. Směrodatná odchylka stanovení byla 20 % vzhledem ke komplexní povaze studovaných materiálů. Kontrola kvality všech chemických analýz byla řízena požadavky kladenými na akreditované laboratoře dle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2018.



4.2 Fytoremediace HCH

Tato část disertační práce popisuje jednotlivé fytoremediační experimenty, které byly provedeny s cílem monitorovat vztah mezi organochlorovanými pesticidy a rostlinami v kontextu fytoremediace. Tato práce vždy popisuje experimentální provedení, průběh jednotlivých pokusů a na závěr se věnuje interpretaci získaných výsledků. Jednotlivé testy byly zaměřené na sledování určitých vlastností rostlin či podmínek kontaminace, které mohou mít vliv na úspěšnost fytoremediace. Konkrétně se jednalo o sledování následujících parametrů:

- genetická predispozice olše lepkavé pro fytoremediaci,
- vliv HCH na germinaci a iniciální fáze vývoje rostlin,
- vliv stáří olše lepkavé a mechanického seříznutí na účinnost fytoremediace,
- rozdíly v účinnosti fytoremediace při výskytu jednotlivých izomerů HCH či zomerní směsi,
- porovnání účinnosti odstranění HCH mezi olší lepkavou a dalšími mokřadními druhy rostlin, a
- vliv koncentrace HCH na účinnost fytoremediace.

Společně s monitoringem koncentrací HCH a cíleným stanovením známých degradačních produktů v růstových substrátech a rostlinné tkáni byly sledovány vybrané fyziologické či morfologické parametry v závislosti na designu experimentu. V první fázi výzkumu byly u cílových rostlin monitorovány změny v hormonálním systému způsobené přítomností organochlorovaného pesticidu. V pokročilé fázi výzkumu byly sledovány změny v sekundárním metabolismu rostlin společně se snahou o identifikaci dosud neznámých metabolitů a transformačních produktů HCH prostřednictvím necílové analýzy.

Design fytoremediačních experimentů souvisí především s vlastnostmi kontaminované lokality. V tomto případě byly experimenty prováděny s návazností na lokalitu Hájek (Česká republika, 50°17'31.5" N 12°53'35.2" E) a proto výsledky níže uvedených experimentů nelze generalizovat, ovšem lze je použít jako výchozí zdroj informací pro jiné lokality s výskytem kontaminace organochlorovanými pesticidy.



4.2.1 Genetická predispozice olše lepkavé pro fytořemediaci a vliv HCH na germinaci a iniciální fáze vývoje rostlin

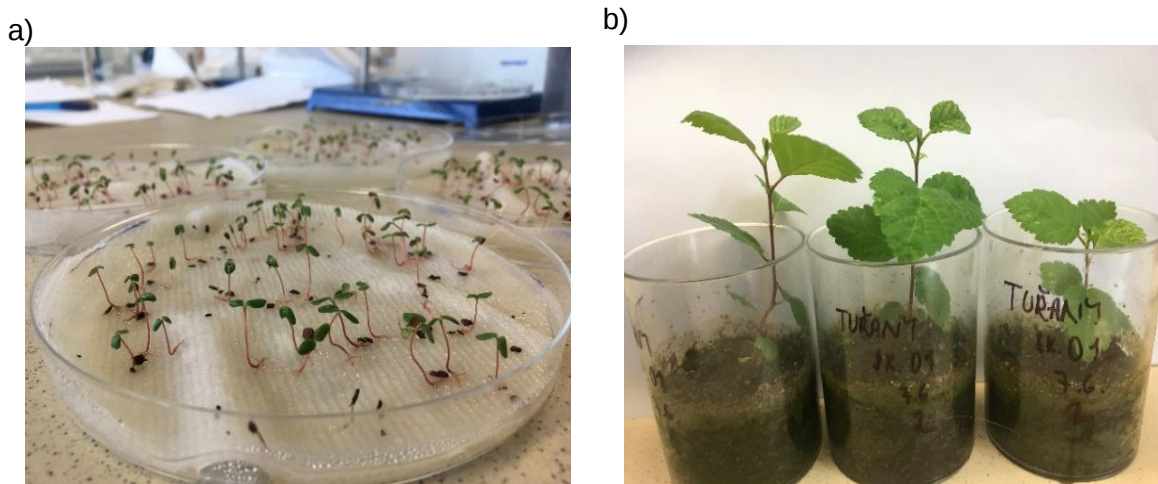
Olše lepkavá představuje rychle rostoucí dřevinu, která je rozšířena ve většině Evropy a představuje důležitou složku břehových ekosystémů, kde plní ekologické i mechanické funkce (Durrant et al. 2016). Olše lepkavé velice dobře snášejí silně zamokřené a nutričně chudší půdy a současně jsou schopné zlepšovat kvalitu půdy díky symbióze s aktinomycety rodu *Frankia*, které dokáží fixovat vzdušný dusík (De Kort et al. 2014; Deptuła et al. 2020). Tyto vlastnosti činí tuto dřevinu možným kandidátem pro řediací účely především v blízkosti povrchových toků a v mokřadních systémech. Během posledních let došlo k významnému rozšíření invazivního patogenu *Phytophthora ×alni*, který je zodpovědný za chřadnutí olší, což má nepříznivý efekt v oblasti vodohospodářství, lesnictví a ochrany přírody (Černý et al. 2010). Prevencí šíření tohoto onemocnění může být přednostní využití rezistentních genotypů. Odlišné genotypy ovšem mohou vykazovat rozdílné vlastnosti v případě akumulace kontaminantů a dlouhodobého přežití v jeho přítomnosti. Tato problematika byla studována v případě akumulace DDT a kadmia prostřednictvím 23 různých genotypů skočce obecného (Huang et al. 2011), u kterých byla prokázána variabilita v příjmu a akumulaci těchto vybraných polutantů. Současně také genetické predispozice ovlivňují hormonální systém rostlin (de la Torre-González et al. 2017; Kojima et al. 2009), čímž mají vliv na jejich fyziologické procesy.

Cílem této studie je zhodnotit vliv δ -HCH na germinaci a ranou fázi růstu potomků rezistentních genotypů olše lepkavé a zároveň prokázat jejich schopnost růst, vyvíjet se a dlouhodobě přežít v kontaminované zemině. Tento izomer byl vybrán z důvodu jeho dominantního výskytu na lokalitě Hájek. Současně byl v rámci studie monitorován obsah izomeru v rostlinné matrici pro posouzení bioakumulačních schopností potomků jednotlivých genotypů a určen vliv přítomnosti δ -HCH na kvalitativní či kvantitativní změny hormonálního systému jako ukazatele pro predikci dlouhodobého přežívání sazenic v kontaminovaném prostředí.

Pro následující experimenty byla jako rostlinný materiál použita semena získaná z kontrolovaného opylení šesti rezistentních genotypů olší (jmenovitě se jednalo o genotypy Tloskov, Bečva, Březové, Tuřany, Lásenice a Valtěřov), která byla poskytnuta Výzkumným ústavem Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i..



Tento rostlinný materiál byl podroben dvěma pokusům - jednalo se o germinační test a fytoremediační test. První ze jmenovaných experimentů zahrnoval krátkodobou dvanáctidenní studii vlivu 100 μg δ -HCH na vybrané germinační parametry (celková klíčivost, rychlost klíčivosti, energie klíčivosti semen) a hormonální systém. Germinační test byl proveden na Petriho miskách (Obrázek 5a) za kontrolovaných podmínek klimatické komory pro minimalizaci vlivu prostředí. Mezi kontrolovanými podmínkami byla vlhkost prostředí, světelná perioda a teplota.



Obrázek 5: Provedení germinačního (a) a fytoremediačního experimentu (b)

Následně byla se stejným rostlinným materiálem provedena tříměsíční studie zaměřená na remediační potenciál sazenic (Obrázek 5b). Tento dlouhodobý experiment probíhal v plastových květináčích obsahujících růstový substrát smíšený se 100 μg δ -HCH a s příslušnou sazenicí daného genotypu. Mimo ošetřenou skupinu byla připravena i skupina kontrolní bez přítomnosti δ -HCH a také neosázený růstový substrát obsahující δ -HCH pro hodnocení vlivu environmentálních podmínek (světlo, vlhkost, činnost mikroorganismů) na přítomný δ -HCH. Veškeré vzorky byly připraveny v biologických triplicátech. Hodnocen byl vliv přítomnosti rostliny na odstranění δ -HCH ze zeminy, příjem a akumulace δ -HCH rostlinou, morfologické parametry (biomasa, výška rostliny) a změny týkající se monitorovaných fytohormonů. Pro stanovení HCH a chlorobenzenů jako hlavních degradačních produktů byla použita analytická metoda, která je popsána v kapitole 4.1.3 Stanovení HCH a degradačních produktů.



Analýza rostlinných hormonů byla provedena pomocí metody a přístrojového zařízení uvedených v kapitole 4.1.1 Cílené stanovení vybraných rostlinných hormonů.

Po ukončení jak germinačního, tak fytoimediačního experimentu byla data statisticky a vizuálně vyhodnocena prostřednictvím softwaru Origin verze 2019b (OriginLab Corporation, USA). Pro porovnání dat týkající se germinačních parametrů byl využit Studentův nepárový t-test.

4.2.1.1 Výsledky germinačního experimentu

Získané výsledky ukázaly, že genetická predispozice hraje zásadní roli v odolnosti vůči abiotickým faktorům jako je studovaný δ -HCH. Zkoumaný izomer totiž ovlivnil hodnoty germinačních parametrů testovaného rostlinného materiálu a to v různé míře. Výsledky těchto parametrů jsou uvedené v následující Tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky sledovaných germinačních parametrů

Genotyp olší	Celková klíčivost [%]	Energie klíčení [%]	Rychlost klíčení [%]
	Rozdíl oproti kontrolní skupině [%]	Rozdíl oproti kontrolní skupině [%]	Rozdíl oproti kontrolní skupině [%]
Bečva	-20.95	-68.12*	-58.12*
Březové	+31.20*	+16.13	-12.46
Lásenice	0.00	-20.19	-18.37
Tloskov	-27.27*	-13.89	+23.58
Tuřany	-37.28*	-60.61*	-17.31
Valtěřov	-26.47	-26.92	-21.01

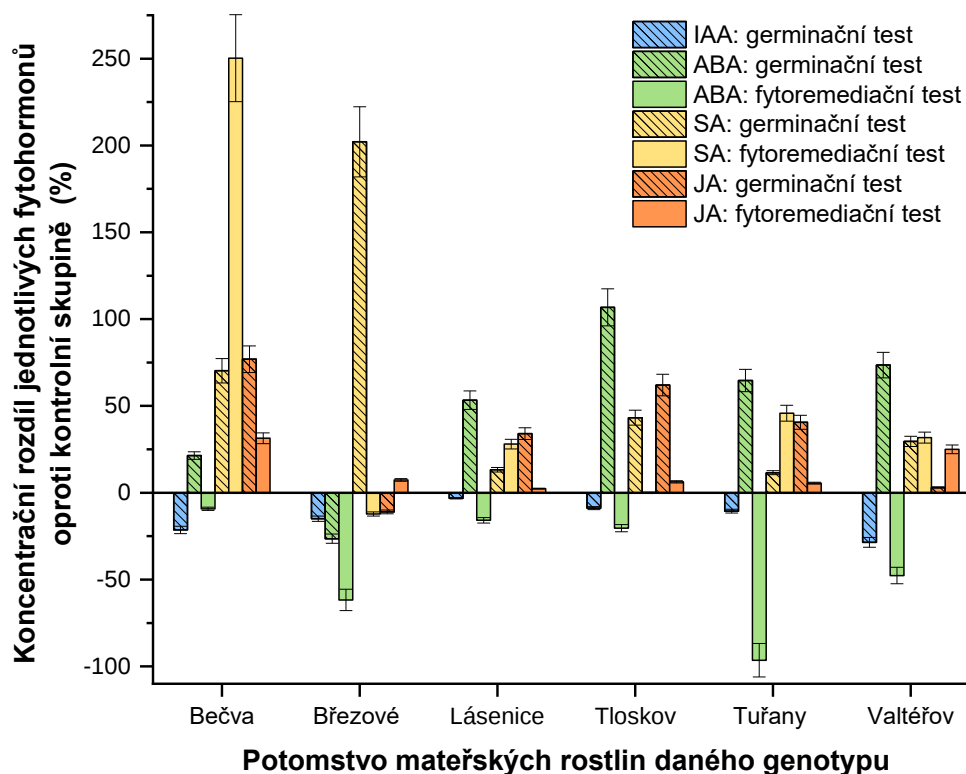
Hodnoty jsou uvedeny jako průměrné hodnoty; údaje jsou získané analýzou biologických triplikátů; celkem bylo použito 150 semen od každého genotypu a ošetření; * označení statisticky významných rozdílů mezi ošetřenými a kontrolními skupinami pomocí Studentova t-testu, $p < 0,05$.

U většiny vzorků převládal negativní efekt δ -HCH na sledované germinační parametry. Výjimkou bylo potomstvo genotypu Březové, kde přítomnost sledované látky statisticky významně stimulovala celkovou klíčivost.



Tento efekt je znám jako hormeze, kdy netoxická koncentrace chemické sloučeniny může stimulovat klíčení či růst rostliny (Calvelo Pereira et al. 2010). U potomstva genotypu Lásenice nebyla celková klíčivost ovlivněna, ale energie klíčení a rychlost klíčení vykazovaly oproti kontrolní skupině snížené hodnoty.

Potlačení germinace, ve většině případů, korelovalo se zvýšenou koncentrací ABA, jejíž fyziologickou funkcí je odklad klíčení v případě nepříznivých podmínek (Tuteja 2007). Synergický efekt s ABA mají i jasmonáty. Bylo prokázáno, že exogenní aplikace jasmonátů společně s jejich prekurzorem OPDA (12-oxo-fytodienová kyselina) má synergický efekt s ABA v případě inhibice germinace. Bylo také pozorováno, že při zvýšení koncentrace ABA v reakci na abiotický stres (sucho či salinita) dochází ke zvýšení koncentrace JA (Pan et al. 2023). Toto zvýšení může být způsobeno ABA mediovanou podporou syntézy JA prostřednictvím dráhy zahrnující serin/threonin kinázu 10, transkripční faktor bZIP72 a alenoxidovou cyklázu (Wang et al. 2020b). Výsledky hormonální analýzy ukazují, že ve všech vzorcích, mimo genotyp Březové, došlo k nárůstu koncentrace ABA i JA oproti kontrolní skupině, která nebyla vystavena působení δ -HCH. Celková germinace jednotlivých variant tedy odráží i rozdílnosti v hormonálním systému způsobené především JA a ABA. Dalším sledovaným fytohormonem byl IAA. IAA představuje základní růstový hormon (Dilworth et al. 2017) a snížení jeho koncentrace vede ke zkrácení délky rostliny (Tian et al. 2008). Pokles délky výhonků během germinačního experimentu byl pozorován u všech skupin ošetřených δ -HCH. Přestože pokles nebyl ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky významný, nižší koncentrace IAA podpořila předpokládaný negativní efekt tohoto izomeru na délku výhonků. Antagonistický vztah byl zaznamenán mezi JA a SA. V případě krátkodobého působení δ -HCH docházelo ke zvýšení koncentrací JA a naopak snížení SA (Obrázek 6). Tento antagonismus byl již dříve zaznamenán u rostlin, které byly vystaveny působení škůdců (Takahashi et al. 2004) nebo zvýšené koncentraci solí (Singh a Gautam 2013).



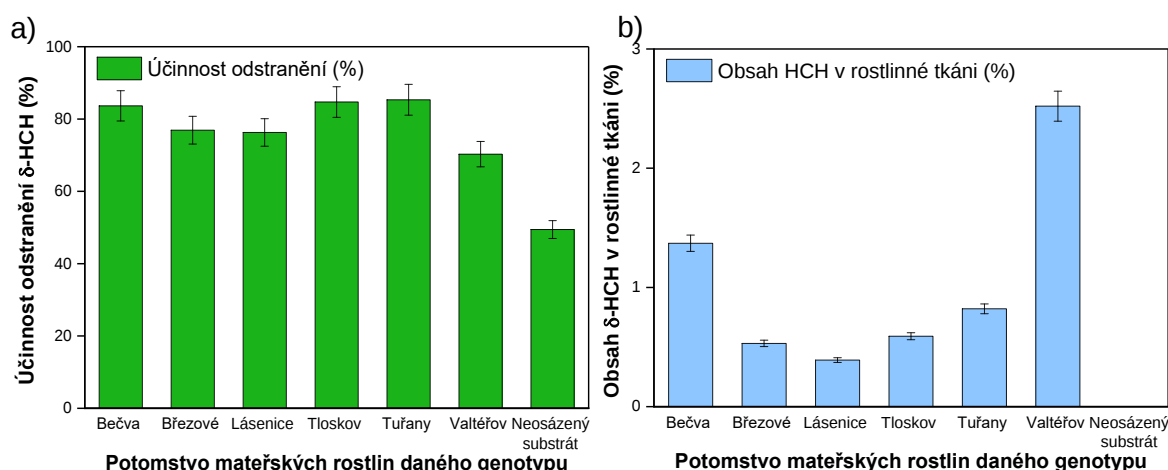
Obrázek 6: Rozdíl v zastoupení sledovaných rostlinných hormonů během germinačního a fytochemického experimentu oproti v porovnání s kontrolními skupinami

4.2.1.2 Výsledky fytochemického testu

Fytochemický test probíhal po dobu tří měsíců. Po uplynutí této doby byly sazenice sklizeny a společně s růstovým substrátem zpracovány dle požadavků analytických metod uvedených v kapitole 4.1. Analýzou neosázeného substrátu bylo zjištěno, že při nastavených experimentálních podmínkách dochází k podstatnému snížení koncentrace HCH. Toto snížení činilo téměř 50 % původní dávky sledovaného izomeru a může být následkem evaporace HCH společně s činností mikrobiologických společenstev. Přítomnost rostliny následně zvýšila účinnost odstranění δ -HCH v porovnání s neosázenou kontrolou o 21 - 36 % původní koncentrace, přičemž stanovené množství δ -HCH v rostlinné biomase bylo pouze do 2,5 % původní dávky δ -HCH (Obrázek 7).



V tomto případě tedy nedošlo k žádné výraznější bioakumulaci sledovaného izomeru. Možným vysvětlením rozdílu mezi aplikovaným množstvím δ -HCH a kvantifikovaným δ -HCH v substrátu je nepřímý vliv rostliny na odstranění HCH a to prostřednictvím podpory rhizosférických mikroorganismů, fytovolatilizace, či tvorbou neznámých degradačních (mezi)produktů (Amirbekov et al. 2024; Laquitaine et al. 2016; Puentes Jácome et al. 2021).



Obrázek 7: Účinnost odstranění (a) a obsah HCH (b) dle jednotlivých potomstev mateřských rostlin daného genotypu

Ze sledovaných fytohormonů nebyla detekována IAA a byl pozorován opačný koncentrační trend u JA a SA než v případě germinačního testu, což svědčí o možné, časově závislé odpovědi na stresový stimul prostřednictvím těchto dvou hormonů (Obrázek 6). Toto tvrzení podporují závěry studie autorů Villette et al. (2019), kteří ve své práci vystavily rostliny topolu dlouhodobému působení mikropolutantů. Výsledky této studie dokládají zvýšené hodnoty SA doprovázené sníženou syntézou prekurzorů pro JA jako reakci rostlin na chronický stres s cílem zajištění konzistentních obranných mechanismů a rozvoji systémové získané rezistence (Villette et al. 2019).



4.2.1.3 Závěry studie

Sledovaná koncentrace δ -HCH představuje pro sazenice rostlin abiotický faktor, který má nepříznivý efekt na morfologické i fyziologické parametry. V této studii bylo prokázáno, že genetická predispozice ovlivňuje odpověď rostlinného organismu na chemickou sloučeninu a určité genetické varianty mohou poskytovat výhody, které rostlinám umožní odolávat působení studovaných organochlorovaných pesticidů. Na základě výsledků germinačního i fytoformačního experimentu lze usuzovat, že vhodnými kandidáty pro lokality kontaminované HCH s možným výskytem patogenu *Phytophthora ×alni* lze považovat potomstva mateřských stromů Březové a Tuřany. Přítomný δ -HCH nebo vzniklé nezjištěné metabolity podporovaly klíčení a vývoj semen genotypu Březové. I když účinnost odstraňování a fytoakumulace v semenáčcích vykazovaly nižší hodnoty, vliv polutantu na fytohormonální systém byl během dlouhodobého pokusu nevýznamný, což by mohlo svědčit o dlouhodobé prosperitě těchto semenáčků. Současně koncentrace δ -HCH v rostlinné tkáni byla druhá nejnižší, což by mohlo být výhodou při využitím biomasy pro další účely (např. tvorba biouhlu). Přestože u potomků genotypu Tuřany byla negativně ovlivněna klíčivost, remediační účinnost byla nejvyšší a v dlouhodobém experimentu nebyl zjištěn statisticky významný negativní efekt na morfologické parametry.

Potomstva genotypů Bečva a Valtěřov nemusejí být pro remediace vhodná, a to z důvodu vyšších obsahů δ -HCH v biomase, čímž se snižuje možnost využití biomasy pro jiné účely. Zároveň tato vyšší množství δ -HCH korelují s negativním vlivem na sledované morfologické parametry. U potomstev genotypů Lásenice a Tloskov vykazoval aplikovaný δ -HCH negativní efekt na germinační parametry a při dlouhodobé expozici část semenáčků odumřela, což je velmi pravděpodobně důsledkem nepříznivých účinků HCH.

Bližší informace ohledně této studie lze dohledat v odborném časopise *Ecotoxicology and Environmental Safety* v publikovaném článku - Košková (Vrchovecká), S., Štochlová, P., Novotná, K., Amirbekov, A. & Hrabák, P. Influence of delta-hexachlorocyclohexane (δ -HCH) to *Phytophthora ×alni* resistant *Alnus glutinosa* genotypes – Evaluation of physiological parameters and remediation potential. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 247, 114235 (2022). DOI 10.1016/j.ecoenv.2022.114235.



4.2.2 Vliv stáří olše lepkavé a mechanického seříznutí na účinnost

fytoremediace

Jak již bylo dříve zmíněno v kapitole 2.3.1 s názvem Fytoremediace, účinnost remediace je ovlivněna vlastnostmi rostlin, podmínkami prostředí i typem a koncentrací polutantu. Předchozí experiment byl zaměřen na hodnocení významnosti genetické predispozice olší společně s vlivem δ -HCH na jejich časnou fázi vývoje. Následující studie je také orientována na vlastnosti rostlin a to konkrétně na sledování změny v remediační účinnosti při použití starších sazenic rostlin, specificky se jedná o jednoleté a dvouleté sazenice olše lepkavé.

Druhým sledovaným parametrem byl vliv mechanického seříznutí na fytoremediační účinnost a na rostliny samotné. Cílem tohoto navazujícího experimentu je stanovení remediační účinnosti jednoletých a dvouletých sazenic olše lepkavé při použití kontaminovaného sedimentu z pilotní lokality Hájek a simulovaným založením tzv. „*short rotation coppice culture*“, tedy keřové kultury s opakovaným sklízením biomasy vzhledem k jejím teoretickým využitím pro jiné účely (zdroj biomasy pro spalovny, které jsou vybaveny dioxinovými filtry nebo jako vstupní surovina pro výrobu biouhlu). Majoritním druhem studovaným pro podobná fyto technická opatření je topol, olše byla zvolena vzhledem k zaměření této práce na fyto remediaci s využitím mokřadních systémů pro které topol není vhodný. Současně si experiment kladl za cíl ověřit vhodnost využití rostlinných hormonů jako markerů pro predikci dlouhodobého přežití rostlin, případně využít změny v hormonálním profilu pro detekci kontaminace.

Z předchozího experimentu vyplývá, že přítomnost rostliny zvyšuje eliminaci δ -HCH. Děje se tak, mimo jiné, prostřednictvím podpory půdních mikroorganismů. Dílčím cílem této části disertační práce byl popis změn v mikrobiálním zastoupení v zemině a v oblasti rhizosféry, jelikož zde může být významné synergické působení mezi mikrobiální degradací HCH a činností rostlin, což může představovat slibný přístup ke zvýšení účinnosti remediace organochlorovaných pesticidů. Pozornost byla zaměřena na *lin* geny jejichž produkty kódují enzymy zodpovědné za degradaci HCH. Konkrétně se jednalo o geny *linA*, *linB* a *linD*.



Růstovým substrátem pro tento experiment byl kontaminovaný sediment z pilotní lokality Hájek obsahující majoritně ϵ -HCH s δ -HCH společně s minoritními koncentracemi α -HCH a β -HCH včetně jejich degradačních produktů (CIB). Tento sediment byl důkladně homogenizován a analyzován před začátkem experimentu pro stanovení počáteční koncentrace HCH a CIB. Procentuálně byl nejvíce zastoupen ϵ -izomer ($61,2 \pm 7,2 \%$), následovaný δ -HCH ($33,8 \pm 4,3 \%$), β -HCH ($4,8 \pm 0,4 \%$) a α -HCH ($1,5 \pm 0,1 \%$). Koncentrace sledovaných látek byly v rozsahu od 1,2 až 2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, což navazuje na předchozí fytořediační experiment provedený s olšemi daného mateřského genotypu, u kterého sledovaná koncentrace δ -HCH v růstovém substrátu byla 2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Kontrolní zemina byla odebrána v blízkosti kontaminované lokality pro zajištění co nejvíce podobných půdních vlastností a zároveň byla ověřena nepřítomnost HCH a CIB.



Obrázek 8: Zahájení experimentu - zasazení jednoletých a dvouletých sazenic a jejich případné seřiznutí

Do jednotlivých květináčů bylo umístěno stejné množství substrátu (kontrolní zeminy nebo kontaminovaného sedimentu), do kterých byly následně zasázeny jednoleté či dvouleté olše.



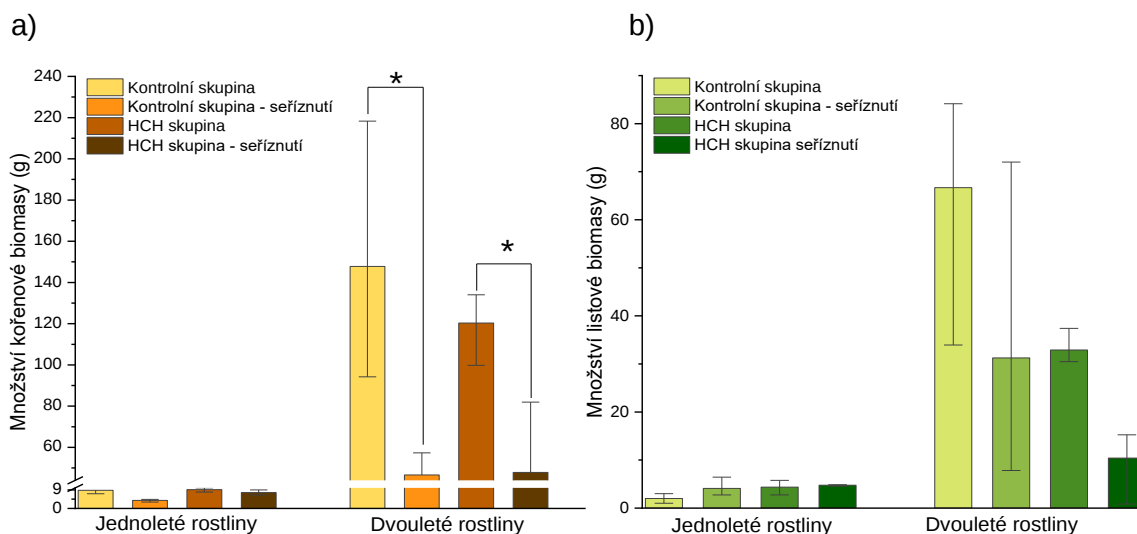
Polovina sazenic z každé věkové skupiny, tedy z kontrolní i ze skupiny exponované kontaminaci, byla sestříhnuta ve výšce 10 cm nad zemínou (Obrázek 8). Celkově vznikly čtyři skupiny ošetření - kontrolní nesestříhnutá skupina, kontrolní sestříhnutá skupina, HCH skupina nesestříhnutá a HCH skupina sestříhnutá. Takto připravené rostliny byly umístěny na venkovním, dobře osvětleném prostranství s dostatečnou zálivkou.

Součástí experimentálního uspořádání byl i neosázený sediment pro kvantifikaci vlivu environmentálních podmínek na odstranění HCH. Po třech měsících byly olše sklizeny a společně se zemínou analyzovány metodou GC/MS pro stanovení koncentračních změn HCH a CIB. Současně byl stanoven hormonální profil kořenové a listové tkáně jednotlivých skupin.

Pro vizualizaci výsledků a jejich statistické hodnocení byl použit software Origin verze 2019b (OriginLab Corporation, USA) s funkcí jednosměrné a dvoucestné ANOVY s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Před statistickou analýzou byl použit Leveneův test homogenity rozptylu.

4.2.2.1 Výsledky

V první řadě byl sledován efekt organochlorovaného pesticidu a mechanického seříznutí na morfologické parametry a to konkrétně na množství kořenové a nadzemní biomasy. Byl zaznamenán úbytek biomasy v obou případech ošetření, ovšem statisticky významný negativní efekt byl pozorován pouze u dvouletých rostlin, kdy se projevil významný úbytek kořenové biomasy v případě mechanického seříznutí (Obrázek 9).



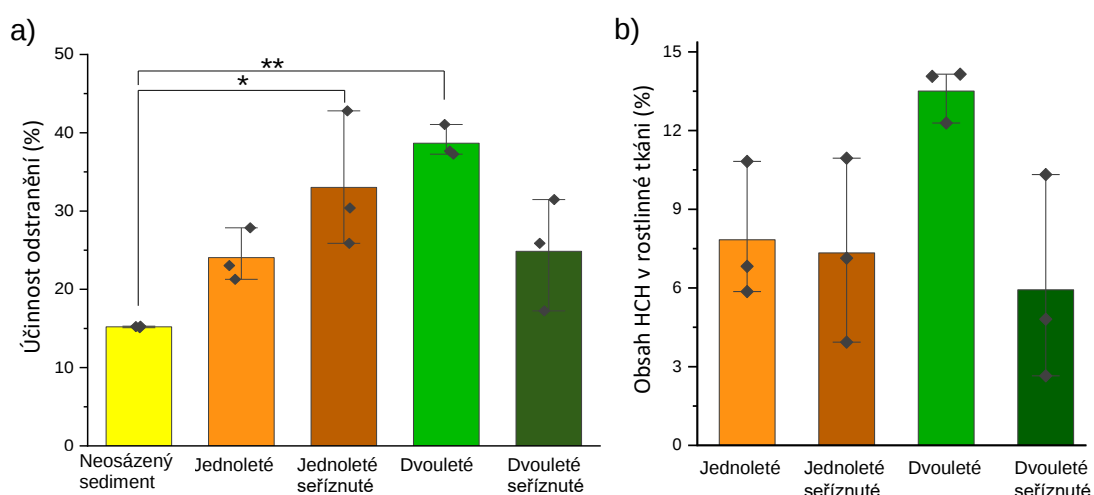
Obrázek 9: Graf popisující množství rostlinné kořenové (a) a listové (b) biomasy v závislosti na věku rostlin a typu ošetření; dvoucestná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Hodnocení remediační účinnosti

Remediační účinnost byla stanovena na základě porovnání výchozích koncentrací HCH a CIB v růstovém substrátu s koncentracemi polutantů po ukončení experimentu. Výsledky tohoto experimentu korelují se závěry předchozí studie a potvrzují funkci rostlin jako remediačního akcelérátoru, který zvyšuje odstranění HCH ze sedimentu o 8,8 - 23,4 % v porovnání s neosázeným sedimentem, u kterého došlo vlivem environmentálních podmínek k odstranění $14,6 \pm 1,8$ % HCH (Obrázek 10a). Dochází tedy k podpoře odstranění nejen v přítomnosti čistě δ -HCH ale i v přítomnosti směsi HCH izomerů společně s CIB. V porovnání s předchozím experimentem také dochází ke zvýšené akumulaci HCH v rostlinné biomase (Obrázek 10b) a to v rozmezí od 6 do 14 % původní dávky (v předchozím experimentu se jednalo o maximálně 2,5 % původní dávky), přičemž nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi jednoletými či dvouletými rostlinami.



V případě neseříznuté skupiny byla remediační účinnost dvouletých olší vyšší v porovnání s jednoletými olšemi a statisticky významně odlišná od neosázeného sedimentu. Při mechanickém seříznutí, kdy došlo k odstranění většiny nadzemní biomasy, byly pozorovány rozdílné důsledky v závislosti na stáří rostliny – v případě dvouletých rostlin byl zaznamenán pokles v remediační účinnosti. Naopak u jednoletých olší bylo pozorováno zvýšení remediační účinnosti po seříznutí (Obrázek 10a)).

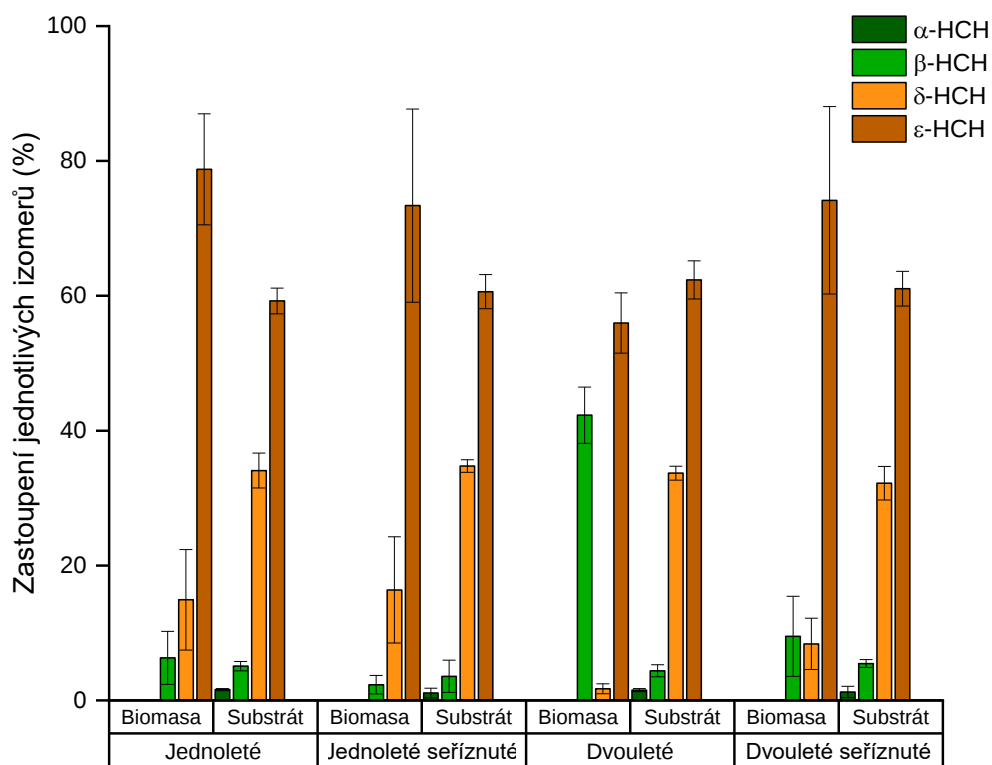


Obrázek 10: a) Graf remediační účinnosti pro neosázený sediment a jednotlivé skupiny rostlin; b) Procentuální obsah HCH v biomase rostlin u skupin rostoucích v kontaminovaném sedimentu; statistické hodnocení - jednosměrná a dvoucestná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$

V předchozím experimentu byla účinnost přisuzována činnosti rhizosférických mikroorganismů, fytovolatilizaci a produkci neznámých degradačních produktů. Tyto jevy mohou být dány do souvislosti s množstvím kořenové biomasy. Množství kořenové biomasy může mít pozitivní efekt na mikrobiální konsorcium, protože představuje prostor pro uchycení mikroorganismů podílejících se na asimilaci a rozkladu HCH. Snížené množství kořenové biomasy u dvouletých olší, způsobené pravděpodobně nedostatkem produktů fotosyntézy, koreluje se sníženou účinností odstranění HCH. Současně kořenová biomasa může ovlivnit příjem polutantu rostlinou, čímž ovlivňuje i navazující metabolismus či fytovolatilizaci.



Preferenčně byl ve vzorcích kořenů nalezen ϵ -HCH následovaný δ -HCH a β -HCH, což odpovídá zastoupení HCH v sedimentu na začátku experimentu (Obrázek 11). V listové tkáni nebyly detekovány žádné izomery HCH ani jejich degradační produkty.



Obrázek 11: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých izomerů v substrátu a rostlinné biomase všech skupin

V rámci tohoto experimentu byly provedeny molekulárně genetické analýzy růstového substrátu a rhizosféry pro zjištění změn v četnosti mikrobiálního zastoupení. Molekulárně genetické analýzy růstového substrátu byly provedeny před zahájením experimentu i na jeho konci. Na počátku experimentu byla četnost sledovaných genů ve sledovaném kontaminovaném sedimentu vysoká. Po ukončení pokusu nebyla v neosázeném sedimentu přítomnost *lin* genů potvrzena, a naopak v osázených variantách exponovaných HCH četnost sledovaných genů mnohonásobně překročila původní množství bez ohledu na seříznutí či stáří rostlin. Dle těchto výsledků lze usuzovat, že samotná přítomnost rostlin zvyšuje četnost bakterií a to zejména druhů podílejících se na rozkladu sledovaných HCH.



Rozdílné výsledky poskytla analýza vzorků rhizosféry, které vykazovaly vyšší množství celkové bakteriální biomasy a *lin* genů než vzorky růstového substrátu. Geny *linA* a *linD* byly v nejvyšší kvantitě zachyceny u jednoletých seříznutých sazenic, což může být další parametr vysvětlující vyšší účinnost odstranění organochlorovaných pesticidů prostřednictvím této skupiny rostlin.

Výsledky hormonální analýzy

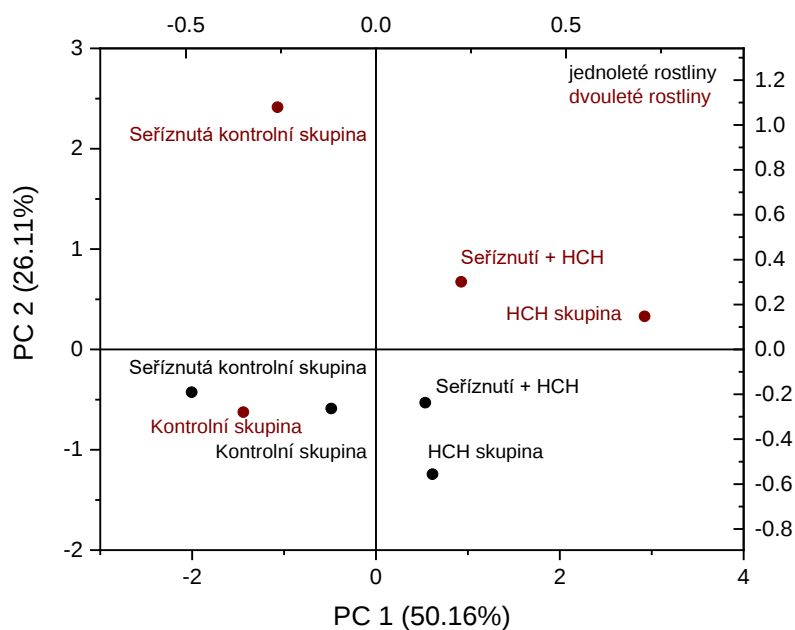
V případě analýzy rostlinných hormonů byly sledovány koncentrační změny zástupců auxinů, ABA, JA a SA v kořenové i listové části rostlin. Jak v případě chemického stresu, tak v případě mechanického seříznutí rostliny došlo ke kvantitativním změnám monitorovaných fytohormonů. Získané výsledky byly velice variabilní vzhledem k vysokému množství dostupné biomasy, vzorkování jejího malého podílu a nestabilitě hormonů. Přesto však byly pozorovány souvislosti mezi změnami v hormonálním systému a stářím rostlin, přítomností HCH a mechanickým seříznutím. Snížení koncentrace IAA oproti kontrolní skupině bylo pozorováno v obou případech ošetření, což odpovídá pozorovanému snížení množství biomasy vzhledem k funkci IAA jako jednomu z hlavních růstových mediátorů (Dilworth et al. 2017). ABA byla dalším sledovaným hormonem, který mimo dormanci semen a germinaci, ovlivňuje osmotickou rovnováhu a hospodaření s vodou prostřednictvím regulace stomat (Sah et al. 2016). Při akumulaci ABA ve svěracích buňkách průduchu dochází ve spolupráci s dalšími elementy signálních drah k uzavření stomat, čímž se sníží ztráty vody a vzroste tolerance rostlin k suchu. Při dlouhotrvajících nepříznivých podmínkách dochází vlivem působení ABA i ke změně genové exprese a produkci specifických antistresových proteinů (Finkelstein 2013). Pozorované snížené koncentrace ABA v listové biomase mohou mít tedy za následek zvýšenou transpiraci rostlin, vyšší příjem vody společně s HCH a zvýšenou intenzitu fytovolatilizace. Tyto jevy se následně projeví ve zvýšení účinnosti remediace a akumulace HCH v rostlinné biomase (Obrázek 10b).

Pozornost dále byla věnována vztahu mezi JA a SA především v listové části rostlin, kde byly zaznamenány vysoké koncentrace těchto fytohormonů. Výsledky naznačují, že reakce na mechanický stres je realizována především zvýšenou koncentrací JA a snížením koncentrace SA a to nezávisle na stáří rostlin.

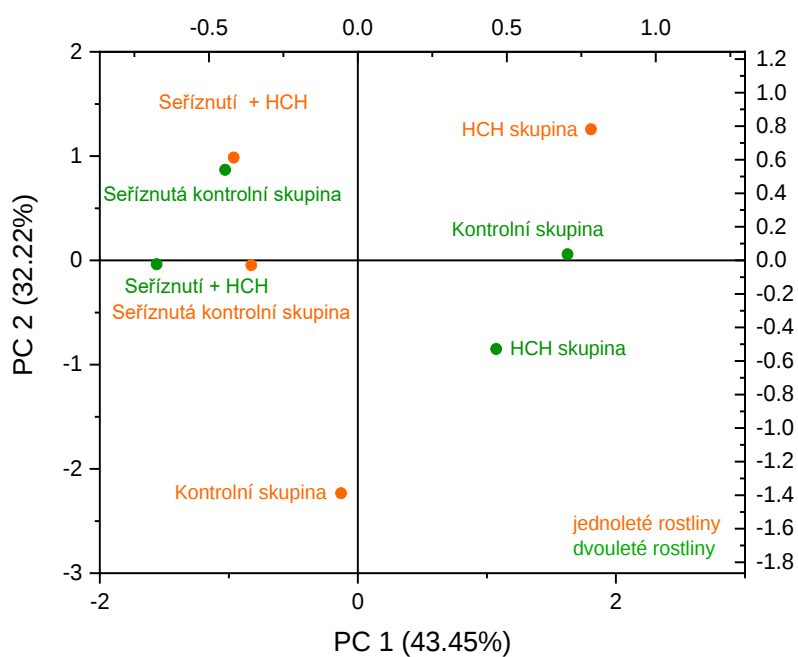


V případě reakce na chemický stres se odpověď liší - u jednoletých rostlin dochází k výraznému navýšení koncentrace SA doprovázený mírným nárůstem JA, zatímco u dvouletých byl pozorován pokles koncentrací u obou těchto fytohormonů. Vysoké koncentrace SA mohou snížit toxický účinek aplikovaného pesticidu v důsledku snížení oxidačního stresu společně s následným zlepšením kvality fotosyntetických pigmentů (Fatma et al. 2018). Sledovaný nárůst SA může tedy v případě jednoletých rostlin zlepšit odolnost rostlin vůči pesticidům. Získané výsledky také naznačují cross-talk mezi SA a ABA a také antagonistický vztah mezi JA a ABA. V předchozím experimentu JA i ABA vykazovaly synergismus v případě klíčení. V tomto experimentu přítomný antagonismus potvrzuje závislost hormonálního cross-talku na vývojovém stádiu rostliny a také cílové struktuře. Tento vztah byl pozorován již dříve u huseníčku, kdy bylo prokázáno, že při napadení rostliny patogenem v kombinaci s působením sucha je přednostní signalizace zprostředkovaná ABA v reakci na abiotický stres (Anderson et al. 2004). Autoři studie si tento jev vysvětlují systémovým a dramatictější efektem sucha na celkový organismus rostliny než lokalizovaným napadením patogenem.

Výsledky hormonální analýzy ukazují, že odpověď rostlin na stresové podněty je ovlivněna stářím rostliny a typem stresu, zároveň je komplexní a zahrnuje mnoho vzájemných interakcí. Pro vizualizaci výsledků hormonální analýzy a hodnocení hormonálních profilů byla následně provedena analýza hlavních komponent (PCA analýza) separátně pro kořenovou a nadzemní část rostliny. U kořenové tkáně (Obrázek 12) došlo k rozdělení většiny výsledků na základě přítomnosti polutantů (první hlavní komponenta, která vysvětluje 50,16 % variability výsledků), což je dané pravděpodobně přímým kontaktem kořenového systému s kontaminovanou zemí. Druhá hlavní komponenta rozdělila hormonální výsledky na základě stáří rostlin. PCA analýza nadzemní části rostlin (Obrázek 13) ukázala, že hormonální profil zjištěný na základě pozorování 6 základních hormonů je ovlivněn především mechanickým stresem a je nezávislý na stáří či přítomnosti chemických látek. Vzhledem k těmto závěrům je obtížné využít sledování hormonálního profilu v nadzemní části rostlin v tomto rozsahu pro jiné účely, například pro účely fytoscreeningu, jako metody detekce kontaminace podpovrchových vod, a to díky snadnému ovlivnění hormonálního systému podmínkami prostředí (sluneční záření, povětrnostní podmínky aj.), nestabilitě hormonů a jejich rychlé degradaci či modifikaci. Výsledky hormonální analýzy však poskytují poznatky o mechanismech, které jsou základem reakce rostlin na kontaminaci HCH.



Obrázek 13: PCA analýza hormonálních výsledků kořenové biomasy



Obrázek 12: PCA analýza hormonálních výsledků nadzemní biomasy



4.2.2.2 Závěry studie

Tato studie hodnotila vliv dvou parametrů (stáří rostlin a mechanické seříznutí), které mohou mít zásadní vliv na úspěšnost fytořediačních technik. Bylo potvrzeno, že jak stáří rostliny, tak mechanické seříznutí mají vliv na účinnost odstranění HCH z růstového substrátu i příjem tohoto pesticidu rostlinou. Analýza vybraných fytohormonů prokázala komplexní, orgánově a vývojově odlišné reakce na stresový podnět. Molekulárně genetické analýzy provedené na vzorcích sedimentu a rhizosféry ukázaly významné změny v četnosti mikrobiálního zastoupení, přičemž přítomnost rostlin výrazně zvyšovala aktivitu bakterií podílejících se na biodegradaci HCH, což potvrdilo, že rostliny mají klíčovou roli v procesu fytořediace.

Na základě získaných výsledků chemické a molekulárně genetické analýzy jsou pro založení keřové kultury s cílem odstranit HCH vhodnější jednoleté rostliny.

Tato studie byla publikována v časopisu Chemosphere pod názvem Synergistic effect of *Alnus glutinosa* saplings and rhizosphere microorganisms on organochlorine pesticides remediation in contaminated soil Chemosphere 373, 144174 (2025), <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144174>. Autoři tohoto článku jsou Aday Amirbekov, Stanislava Vrchovická, Jakub Říha, Stanisław Wacławek, Alena Ševců a Pavel Hrabák.



4.2.3 Rozdíly v účinnosti fytořemediace jednotlivých izomerů HCH

Předchozí studie byly zaměřeny na vlastnosti olše lepkavé, které mohou mít vliv na remediační potenciál (genetická predispozice, stáří rostlin a mechanické seříznutí) a současně byly zaměřeny buď pouze na jeden izomer nebo na směs izomerů společně s jejich degradačními produkty. Tato studie je zaměřena na rozdíly v remediační účinnosti, příjmu a akumulaci jednotlivých izomerů HCH rostlinou. Pro tento experiment byly vybrány izomery α -HCH, β -HCH a δ -HCH. Důvody výběru těchto tří izomerů byly následující: vysoké procentuální zastoupení α -HCH v technické směsi HCH (Willett et al. 1998), prokázaná perzistence β -HCH (Willett et al. 1998) a dominance δ -HCH na cílové lokalitě Hájek (Amirbekov et al. 2023). Současně byla provedena hormonální analýza 72 sloučenin díky spolupráci s Laboratoří růstových regulátorů na Univerzitě Palackého v Olomouci s cílem důkladněji zmapovat změny v hormonálním systému.

Experiment byl zahájen přípravou růstového substrátu. Tento substrát byl připraven smísením nekontaminované zeminy se standardním roztokem jednoho ze sledovaných izomerů na požadovanou koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Vyšší koncentrace aplikované dávky byla zvolena s cílem dosáhnout detekovatelných koncentrací HCH případně CIB i v listové části rostlin. Kontrolní skupina byla tvořena pouze zeminou bez přídavku HCH. Tento experiment byl proveden se sazenicemi olše lepkavé, kdy jednotlivé rostliny byly umístěné separátně do květináčů obsahující buď kontaminovaný nebo nekontaminovaný substrát. Experiment byl proveden v triplicátech pro pokrytí biologické variability. Připravené květináče s rostlinami byly umístěné na venkovní, slunné prostranství, kde byly ponechány po dobu tří měsíců. Po ukončení experimentální doby byly odebrány vzorky substrátu a rostlin a byla zde provedena analýza HCH a CIB pomocí GC/MS metody. Vzorky rostlin byly zpracovány a analyzovány pro sledování kvalitativních i kvantitativních změn v zastoupení vybraných hormonů. Ve vzorcích růstového substrátu a vzorcích odebraných z oblasti rhizosféry byla provedena molekulárně genetická analýza pro monitorování změn v četnosti mikrobiálního zastoupení.

Vliv jednotlivých izomerů HCH na sledované parametry olší byl hodnocen pomocí statistického softwaru Origin v.2019b (OriginLab Corporation, USA). V tomto případě byla použita jednocestná ANOVA a post hoc test (Tukey test), přičemž před analýzou byla všechna data podrobena testu homogenity rozptylu (Levenův test). Všechny statistické analýzy byly provedeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Data pro fytohormonální analýzu byla nejprve logaritmicky transformována a poté podrobena analýze hlavních komponent, aby byla popsána obecná struktura dat. Neparametrický Mann-Whitneyův test byl poté použit k výpočtu významných rozdílů v obsahu fytohormonů mezi rostlinami kontrolní skupiny a skupiny ošetřené HCH.

4.2.3.1 Výsledky

Stanovení remediační účinnosti

Účinnost odstranění HCH se lišila v závislosti na typu izomeru, přičemž nejvyšší účinnosti byly pozorovány pro β -HCH (90,3 %), následované α -HCH (64,9 %) a δ -HCH (57,1 %). V tomto experimentu bylo překvapivě odstraněno vysoké množství izomeru β -HCH, což je v rozporu s jeho perzistentními vlastnostmi. I přesto však existují studie, které rovněž pozorovaly vysoká procenta odstranění tohoto perzistentního izomeru. Při reálných koncentračních úrovních β -HCH ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) v mokřadním systému osázeném několika rostlinnými druhy (*Acorus calamus*, *Canna indica*, *Thalia dealbata*, *Pontederia cordata*) byla účinnost odstranění β -HCH v rozmezí 90,9 až 98,2 % (Chen et al. 2021). Rozdílné účinnosti pro dané izomery jsou ovlivněny fyzikálními a chemickými vlastnostmi jednotlivých izomerů a to především lipofilitou, rozpustností a těkavostí. Nejvíce lipofilním izomerem je δ -HCH s $K_{ow} = 4,14$. Lze tedy předpokládat jeho zvýšenou vazbu na organickou složku půdy provázenou snížením biologické dostupnosti pro rostliny či mikroorganismy (Bianconi et al. 2011). Izomer β vykazuje nejnižší rozpustnost - při vysokých koncentracích je možné vysrážení této látky, které následně ovlivní jak dostupnost pro rostliny a mikrobiální degradaci, tak tvorbu degradačních produktů i analytická stanovení. V porovnání s prvním experimentem (kapitola 4.2.1) provedeným s δ -HCH je účinnost odstranění nižší. Tento rozdíl může být způsobem rozdílným obsahem organické hmoty v růstovém substrátu či koncentrací pesticidu. Přítomnost CIB byla zaznamenána v zemině všech tří variant - nejvyšší koncentrace CIB byly nalezeny u α -HCH, následně u β -HCH a nejnižší δ -HCH.

Zajímavé zjištění pocházelo z molekulárně genetických analýz. Sledované *lin* geny byly zaznamenány ve vzorcích zeminy i rhizosféry, přičemž gen *linB* byl detekován v nejvyšší kvantitě a to především u varianty exponované β -HCH, což koreluje s vysokou účinností odstranění tohoto izomeru. Oproti předchozí studii byly geny *linA* a *linD* v řadě vzorků pod limity kvantifikace metod, případně byly přítomné v nízkých koncentracích.



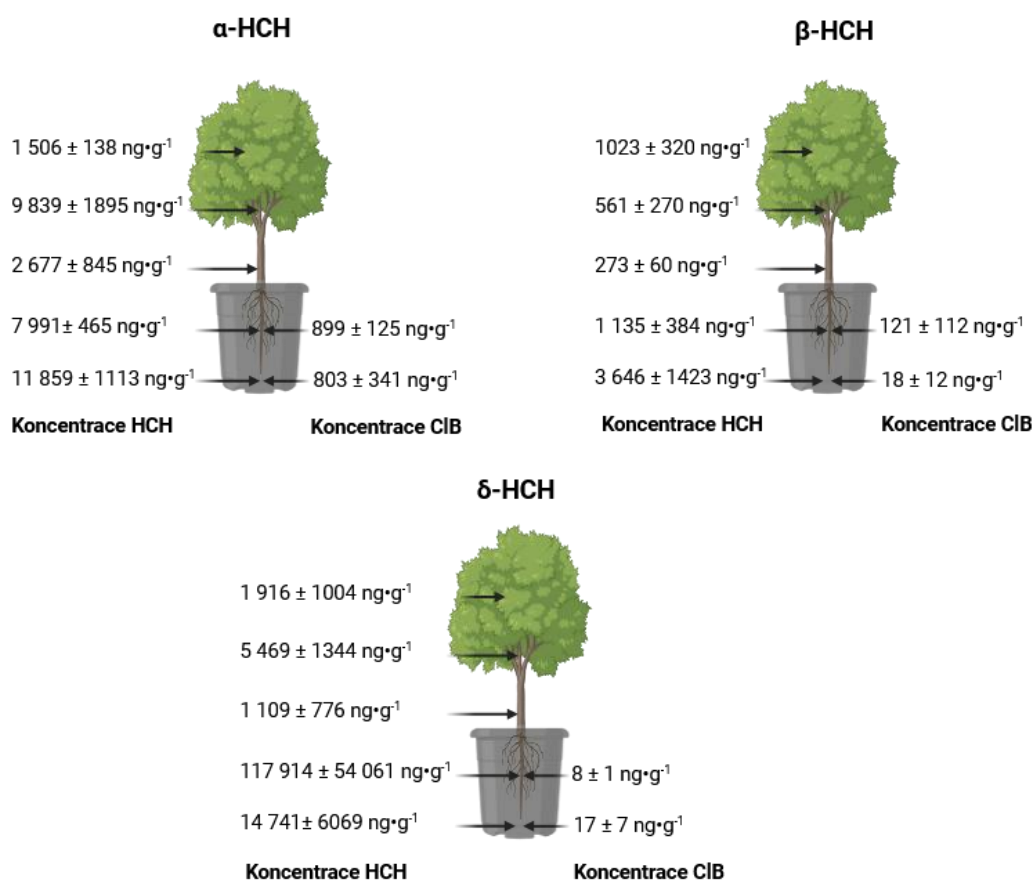
Nízká koncentrace CIB může svědčit o rychlejší degradaci β -HCH. Časná degradace β -HCH může vést k vytvoření volatilnějších CIB v dřívější fázi experimentu a jejich následné transpiraci a/nebo volatilizaci, případně může vést k dalšímu metabolismu, což se tedy projeví nízkými koncentracemi těchto sledovaných metabolitů. Nelze také vyloučit tvorbu neznámých degradačních produktů v celém fytoimediačním systému. Ve variantě exponované β -HCH a δ -HCH byl také detekován izomer α -HCH. Tato studie však neumožňuje lokalizovat přesné místo a procesy, které by mohly vést k transizomeraci těchto izomerů na detekovaný α -HCH.

Stanovení HCH v rostlinné biomase

Po skončení experimentu byly rostliny sklizeny a rozděleny na jednotlivé části (kořeny, kmeny, větve a listy), které byly zpracovány pro GC/MS analýzy dle kapitoly 4.1.3. Chování všech HCH izomerů vykazovalo obdobný vzorec - největší podíl aplikované dávky HCH zůstal navázaný v kořenové biomase. Následně pro α a δ izomer byly pozorovány vyšší koncentrace pesticidu ve větvích než v kmenech a listech. U těchto dvou izomerů lze tento trend vysvětlit vyšší hodnotou tlaku par (Balázs et al. 2018), kdy dochází k příjmu těchto izomerů prostřednictvím transpiračního proudu a postupné volatilizaci z listové plochy. Fyzikální konstanty jednotlivých izomerů jsou uvedeny v Tabulce 6. Detekované koncentrace HCH i CIB jsou uvedeny na Obrázku 14.

Tabulka 6: Fyzikální konstanty jednotlivých izomerů (ATSDR 2005)

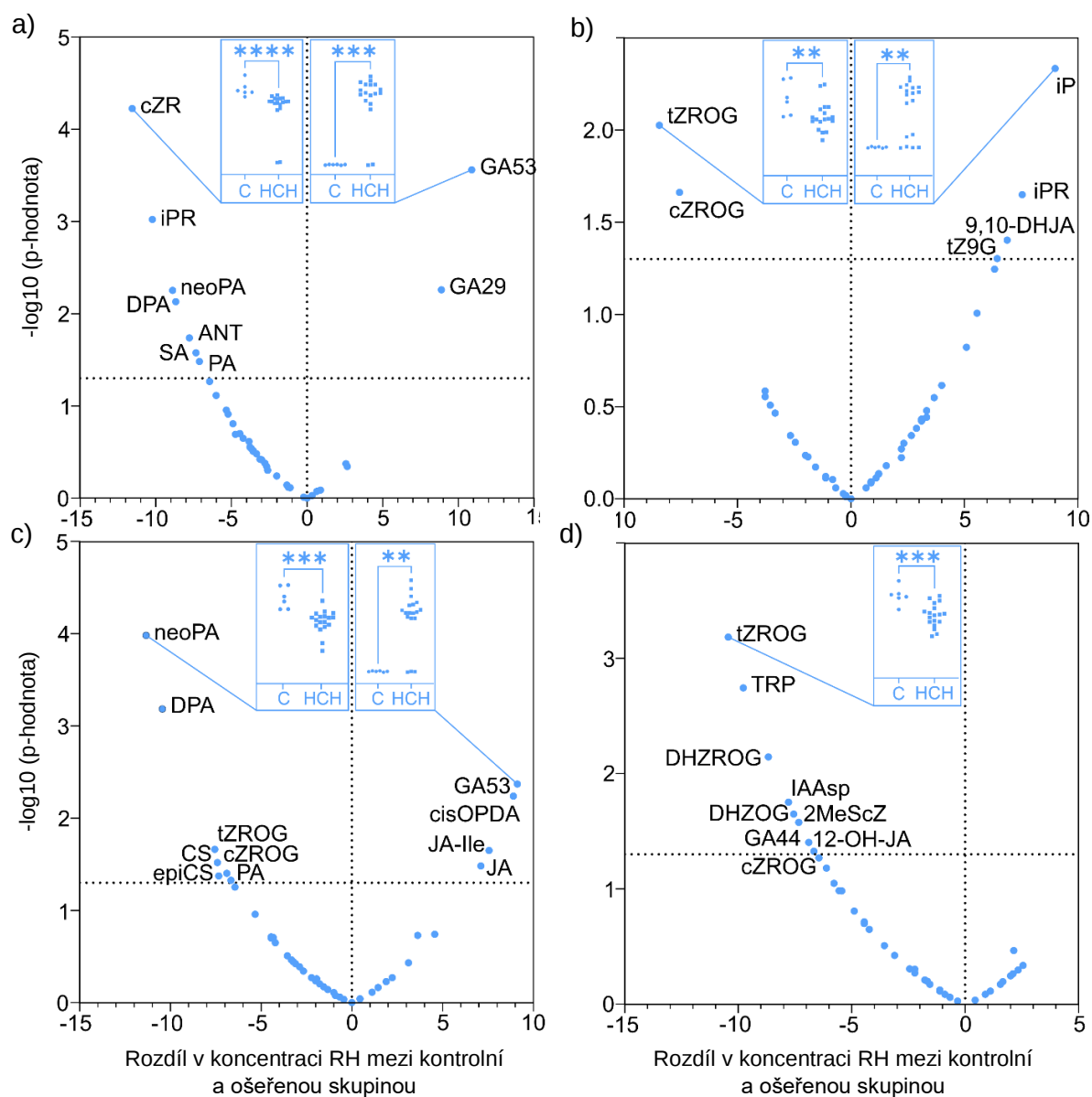
	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH
CAS	319-84-6	319-85-7	58-89-9	319-86-8
Rozpustnost _{voda}	10 ppm	5ppm	17 ppm	10ppm
Rozpustnost _{etanol}	1,8 g/100 g	1,1 g/100 g	6,4 g/100 g	24,4 g/100 g
Log _{kow}	3,8	3,78	3,72	4,14
Tenze par (Pa)	0,006	0,00005	0,0013	0,005
Henryho konstanta	$6,86 \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^{-7}$	$3,5 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-7}$



Obrázek 14: Koncentrace HCH a CIB v jednotlivých částech rostlin a růstovém substrátu pro dané izomery

Výsledky hormonální analýzy

V případě hormonální analýzy bylo sledováno 72 sloučenin, které zahrnovaly jak fytohormony, tak jejich nejvýznamnější metabolity z osmi základních skupin. Výsledky této analýzy jsou znázorněné na Obrázku 15. Jsou zde 4 grafy typu volcano znázorňující jednotlivé rostlinné hormony jako jednotlivé body rozdělené dle koncentračních rozdílů mezi kontrolní a ošetřenou skupinou (vodorovná osa) a záporného logaritmu p-hodnoty vypočtené Mann-Whitneyho testem (svislá osa) a to dle příslušné rostlinné části. Uvnitř každého grafu se nacházejí modré rámečky znázorňující distribuci dat týkající se rostlinných hormonů, které se nejvýznamněji liší dle $-\log_{10}$ p-hodnoty.



Obrázek 15: Vliv HCH na koncentraci fytohormonů v různých částech olše lepkavé: (a) větve, (b) kmen, (c) listy a (d) kořeny; hladina významnosti $\alpha = 0,05$ (znázorněná jako přerušovaná vodorovná linie); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0,0001$



Největší rozdíly v koncentracích fytohormonů byly pozorovány mezi jednotlivými orgány stromků, což je pravděpodobně způsobeno rozdíly ve funkci orgánů a vývojovými zákonitostmi v čase a prostoru. Například kořeny vykazovaly nápadné hladiny 2-methylthio citokininu a indol-3-acetamidu, které slouží jako indikátory bakteriální aktivity (Podlešáková et al. 2013). Nejvyšší koncentrace bioaktivní IAA a většina citokininů byla zjištěna v kmenech stromků, pravděpodobně proto, že homeostáza mezi auxiny a citokiny v kmeni reguluje různé fyziologické funkce, včetně apikální dominance (Kotov et al. 2021). Ve všech orgánech byly hladiny citokininů obecně sníženy u olší pěstovaných v kontaminované půdě, a to bez ohledu na použitý izomer HCH. Toto snížení může souviset s časnou senescencí jako reakcí na stres vyvolaný fytořediačními snahami (Ha et al. 2012). Pozoruhodné je, že isopentenyladenin a isopentenyladenosin v kmenech stromků vykazovaly výjimky z tohoto trendu, což pravděpodobně souvisí s transportními mechanismy citokininů (Zürcher et al. 2016; Osugi a Sakakibara 2015). Kromě těchto výsledků zde byly pozorovány změny v koncentracích dříve sledovaných stresových hormonů - JA, SA i ABA. Byl pozorován nárůst SA společně s antagonismem mezi JA a ABA. Pravděpodobně dochází k aktivaci obdobných signálních drah jako v předchozích experimentech. Mimo tohoto vztahu byl pozorován i antagonismus mezi ABA a gibereliny, kdy snížení koncentrace ABA vysvětluje nárůst hladin giberelinů v rostlinné biomase (Yuan et al. 2011).

4.2.3.2 Závěry studie

Tato studie poukázala na rozdíly v účinnosti odstranění způsobené izomerií HCH. Překvapivě zde nejvyšší úspěšnost vykazovala varianta obsahující β -HCH. Tato vysoká účinnost korelovala s vysokou abundancí *linB* genu mikroorganismů v růstovém substrátu ale vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem tohoto izomeru může být tento experiment do určité míry také ovlivněn omezenou rozpustností β -HCH a jeho vysrážením v růstovém substrátu. I přesto, že substrát byl před samotnou analýzou zhomogenizován, vzorkování malého podílu substrátu může mít vliv na analytická stanovení HCH a CIB. Určitá podobnost byla pozorována v příjmu a distribuci izomerů α -HCH a δ -HCH. Aplikací vysokých koncentrací izomerů bylo potvrzeno, že vybrané olše mohou dlouhodobě přežít v kontaminované oblasti a zároveň tím bylo umožněno detekovat sledované látky v jednotlivých částech rostlin. Přesto tyto vysoké koncentrace nejsou z environmentálního hlediska příliš relevantní.



Z hormonální studie vyplývá závěr, že hormonální profil se odvíjí od typu rostlinného orgánu a jeho funkce, čímž je podmíněná i reakce na přítomné polutanty. Byl zde potvrzen již dříve zmiňovaný cross-talk mezi jednotlivými stresovými hormony (SA, JA, ABA) ale současně zde byly zaznamenány koncentrační změny ve skupině cytokininů a giberelinů způsobené přítomností HCH. Přesto však nebyl pozorován rozdíl v hormonálním zastoupení podmíněný izomerií HCH.

Podrobnější informace k této studii lze nalézt v publikaci Assessing HCH isomer uptake in *Alnus glutinosa*: implications for phytoremediation and microbial response. Autoři této publikace jsou Aday Amirbekov, Stanislava Vrchovická, Jakub Říha, Ivan Petřík, David Friedecký, Ondřej Novák, Miroslav Černík, Pavel Hrabák a Alena Ševců publikované ve Scientific Reports (2024) 14:4187; <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54235-1>.



4.2.4 Bioakumulace a metabolismus HCH vybranými rostlinnými druhy společně s hodnocením vlivu koncentrace HCH na účinnost fytoremediace

Dosud byla sledována účinnost odstranění HCH, případně příjem tohoto organochlorovaného pesticidu olšemi v závislosti na jejich genetické výbavě a stáří, přítomnosti mechanického seřiznutí při vytvoření keřové kultury s opakovaným sklízením biomasy, či na izomerii HCH. V následující kapitole je pozornost věnována rozsáhlému experimentu, který je zaměřený na porovnání fytoremediační účinnosti mezi několika rostlinnými druhy při působení δ -HCH nebo t -HCH a to ve třech různých, environmentálně relevantních koncentracích.

Tato studie představuje rozsáhlý laboratorní experiment zaměřený na akumulaci a metabolismus HCH v hojně využívaných, mokřadních rostlinách (sítina rozkladitá, orobinec širokolistý, rákos obecný) (Branković et al. 2018; Machado et al. 2020; Haghnazar et al. 2023; Mohsin et al. 2023) v porovnání s dosud sledovanou olší lepkavou. Tento experiment byl prováděn v růstových komorách se specificky definovanými podmínkami prostředí pro eliminaci environmentálních vlivů na sledované parametry. Během tříměsíční expozice byly měřeny morfologické (biomasa, výška, relativní obsah chlorofylu) a fyziologické (měření fotosyntézy - rychlost fotosyntézy, stomatální vodivost, transpirace a transpirace ve tmě) parametry pro posouzení vlivu HCH na růst rostlin. Tento test si zároveň kladl za cíl monitorovat metabolismus těchto rostlin prostřednictvím necílené analýzy s cílem identifikace degradačních produktů HCH, které by mohly objasnit metabolismus HCH v rostlinné biomase. Současně prostřednictvím necílové analýzy je možné získat informace ohledně změn v sekundárním metabolismu rostlin vyvolaný přítomností organochlorovaného pesticidu, které by mohly souviset s odolností vybraných rostlin vůči chemickému stresu. Na základě výsledků předchozích experimentů nebyla provedena cílová hormonální analýza. Během předchozích experimentů byla popsána základní hormonální reakce studovaných olší, která je nezávislá na izomerii či koncentraci HCH, hormonální profil nadzemní části je spíše ovlivněn environmentálními podmínkami, tudíž využitelnost pro fytoscreening je omezená a současně je zde problematika nestability hormonů při analytickém stanovení.



Pro experiment byly vybrány mokřadní rostliny - sítina rozkladitá, orobinec širokolistý, a rákos obecný. Na základě výsledků předchozích experimentů byly do experimentu zahrnuty i jednoleté olše. Tyto olše byly potomky mateřských stromů Valtěřov a Březová, u nichž byla dříve prokázána schopnost tolerovat přítomnost HCH (genotyp Březová) a schopnost bioakumulace HCH (genotyp Valtěřov) (Košková et al. 2022). Jednotlivé rostliny byly umístěny do separátních květináčů, ve kterých byly opakovaně exponovány t-HCH nebo δ-HCH a to v koncentraci 20, 200 nebo 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Celkově byly rostliny vystaveny působení 24 μg , 240 μg , 1200 μg HCH. Součástí experimentálního nastavení byly kontrolní skupiny - rostliny bez aplikace HCH a také neosázený substrát vystavený příslušnému HCH o určité koncentraci s cílem pozorovat vliv půdní mikrobioty na odstranění HCH a tvorbu degradačních produktů bez kooperace s rostlinami. Dokončené přípravy rostlin před zahájením experimentu jsou zobrazeny na Obrázku 16.



Obrázek 16: Připravené rostliny v růstovém substrátu před zahájením experimentu

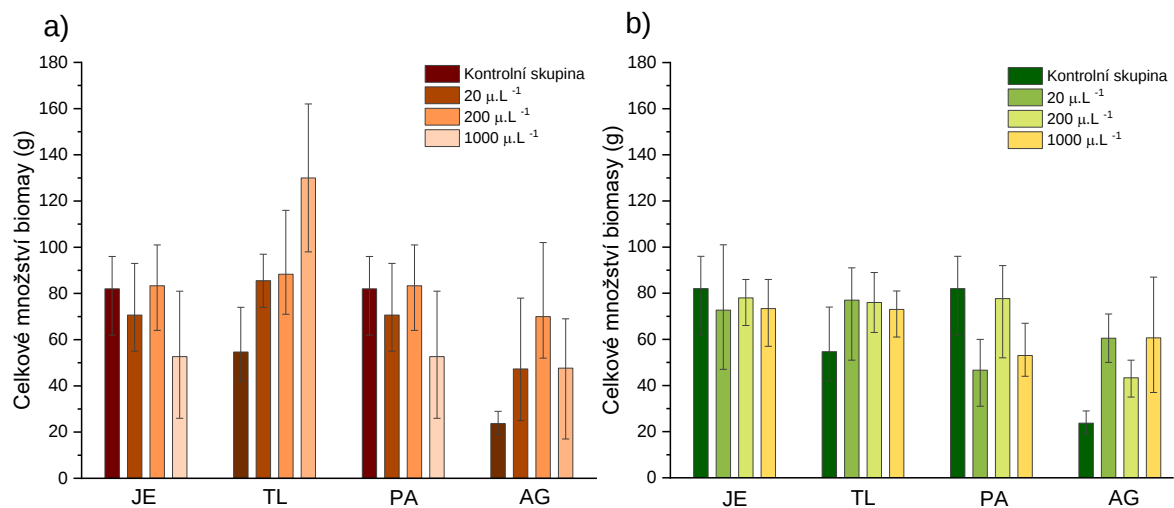
Během expoziční doby byly u všech rostlin měřené morfologické i fyziologické parametry. Jednalo se o měření výšky, váhy, průměru stonku rostlin, obsahu chlorofylu a fotosyntetických parametrů (rychlost fotosyntézy, stomatální vodivost a transpirace). Po ukončení pokusu byly měřeny koncentrace HCH v růstovém substrátu i kořenové a nadzemní části rostlin. Současně byl rostlinný materiál analyzován necílovou analýzou pro sledování změn v sekundárním metabolismu a metabolických přeměn HCH.



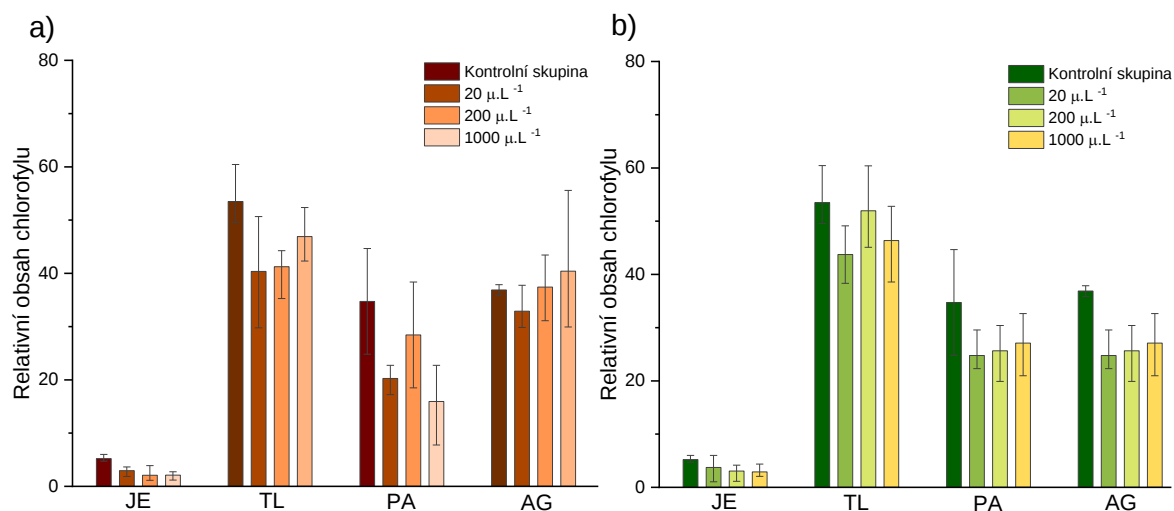
Pro analýzu a zobrazení výsledků byl použit statistický software Origin v.2019b (OriginLab Corporation, USA). Pro hodnocení sledovaných parametrů byla použita jednocestná ANOVA a post hoc test (Tukey test), přičemž před analýzou byly všechna data podrobena testu homogenity rozptylu (Levenův test). Hladina významnosti α byla opět stanovena na hodnotu 0,05.

4.2.4.1 Výsledky

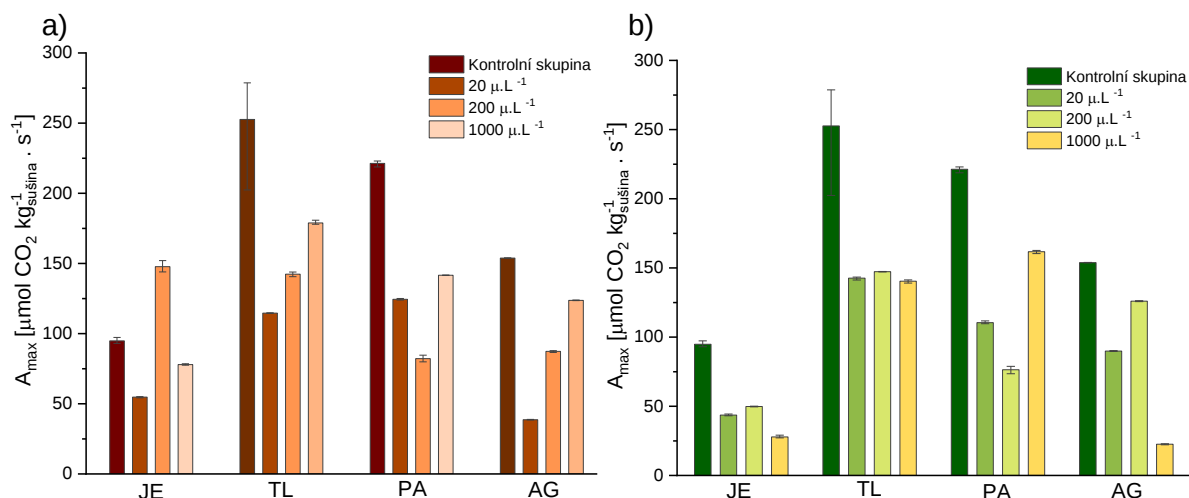
Výsledky sledovaných morfologických i fyziologických parametrů jsou velice variabilní a ve většině případů zde není statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ mezi skupinou ošetřenou t-HCH či δ -HCH na jakékoliv koncentraci a skupinou kontrolní. Přesto lze pozorovat určité trendy. Obdobně jako v první studii (Košková et al. 2022) i v tomto experimentu došlo v případě olší vystavených působení HCH ke zvýšení celkové biomasy oproti kontrolní skupině. Výsledky naměřených hodnot biomasy jsou uvedeny na Obrázku 17. Dalším sledovaným parametrem byl relativní obsah chlorofylu (Obrázek 18), který byl negativně ovlivněn, ale bez statistické významnosti. Nejvýznamnější pokles byl pozorován u rákosu obecného. Získané výsledky korelují se závěry studie autorů Faure et al. z roku 2012. V této studii autoři vystavili rostliny rákosu působení CIB a HCH s cílem monitorovat fyto toxicitu těchto látek, přičemž pozorovali významný pokles koncentrace chlorofylu. Pokles koncentrace chlorofylu může být dán i do souvislosti s pozorovaným nepříznivým efektem HCH na sledované fotosyntetické parametry. Vzhledem k časové náročnosti analýz byla fotosyntetická měření provedena vždy třikrát na jedné rostlině daného druhu z dané skupiny a tudíž pozorované hodnoty nezahrnují biologickou variabilitu. Proto výsledky těchto analýz mají být považovány spíše za prvotní screening vlivu chemické látky na zkoumané druhy rostlin. Pro ilustraci jsou na Obrázku 19 uvedeny hodnoty maximální rychlosti fotosyntézy ($A_{\max}$) za podmínek saturačního ozáření.



Obrázek 17: Celková biomasa pro všechny druhy rostlin a) ošetřené δ -HCH; b) ošetřené t -HCH; JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá; Statistické hodnocení: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$



Obrázek 18: Relativní obsah chlorofylu pro všechny druhy rostlin a) ošetřené δ -HCH; b) ošetřené t -HCH; JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá; Statistické hodnocení: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



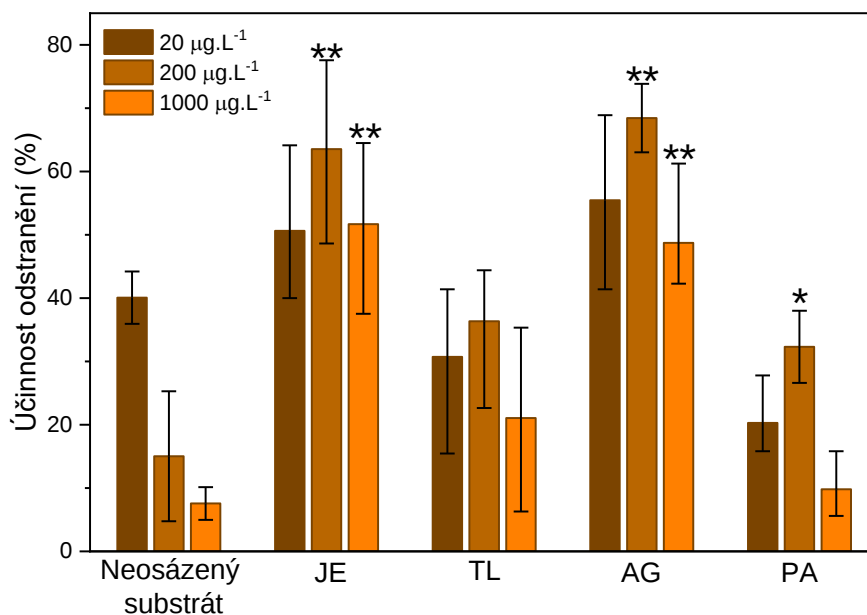
Obrázek 19: Maximální rychlost fotosyntézy za saturačních podmínek pro všechny druhy rostlin a) ošetřené δ -HCH; b) ošetřené t-HCH; JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá; Statistické hodnocení: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Hodnocení remediační účinnosti

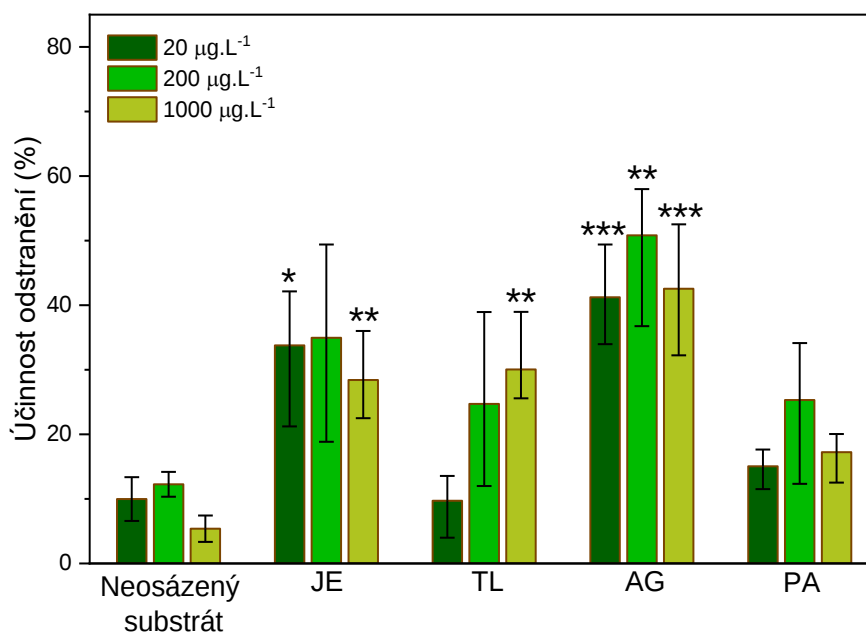
Izomery HCH a související CIB metabolity byly stanoveny v růstovém substrátu i rostlinné biomase. Odstraňování izomerů HCH ze substrátu závisí na chemickém složení substrátu, koncentraci HCH a druhu rostliny. Kontrolní neosázená půda poskytla informace o chování HCH v růstovém substrátu za experimentálních podmínek. Pokles koncentrace HCH byl přisuzován biotické i abiotické degradaci, odpařování či adsorpci na samotný materiál květináčů. Průměrná procentuální hodnota odstranění HCH v těchto kontrolách činila přibližně 25 % původní dávky δ -HCH a 15 % původní dávky v případě t-HCH. V případě rostlinných druhů bylo stanoveno množství HCH v půdě, kořenech a nadzemních částech a na jejich základě bylo odhadnuto chybějící množství HCH odečtením těchto hodnot od celkového množství aplikovaného HCH. Tato množství byla pravděpodobně odstraněna již dříve zmíněnými procesy (transformace a degradace činností rhizosféry nebo samotné rostliny, fytovolatilizace aj.). Získané výsledky (uvedeny na Obrázku 20 a 21) ukazují, že přítomnost rostliny ve většině případů podpoří odstranění HCH z růstového substrátu. V případě expozice rostlin δ -HCH je účinnost odstranění vyšší než v případě vystavení rostlin směsi izomerů HCH.



U skupiny ošetřené δ izomerem rostliny umožnily odstranit o 12 - 42 % více aplikované látky při srovnání s neosázenou kontrolou. Ve skupině exponované t-HCH byly tyto hodnoty nižší - 9 - 31 %. To je v souladu s přítomností perzistentnějších izomerů beta a gama v t-HCH. V obou případech ošetření vykazovaly vyšší účinnosti olše a sítiny než orobinec a rákos.



Obrázek 20: Účinnost odstranění δ -HCH u všech rostlinných druhů (JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá); statistické hodnocení přítomnosti rostlin ve srovnání s neosázenou kontrolou: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



Obrázek 21: Účinnost odstranění *t*-HCH u všech rostlinných druhů (JE - sítina rozkladitá, TL - orobinec širokolistý, PA - rákos obecný, AG - olše lepkavá); statistické hodnocení přítomnosti rostlin ve srovnání s neosázenou kontrolou: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Důležitým faktorem, který se může podílet na odstraňování HCH, je struktura kořenů. Orobinec společně s rákosem patří do skupiny rostlin s rhizomatickým kořenovým systémem (Prathna 2021), zatímco sítina rozkladitá je klasifikována jako rostlina s hlubokým vláknitým kořenovým systémem (Mohlenbrock 1989). Rostliny s hlubokým vláknitým kořenovým systémem mají výhodu většího povrchu, který představuje větší prostor pro uchycení mikroorganismů podílejících se na asimilaci a degradaci kontaminantů (Prathna, 2021). Mikroorganismy tedy představují další významný prvek ovlivňující odstranění chemických látek z prostředí, přičemž individuální vliv rostliny bez rhizosférických mikroorganismů nelze plně definovat. Provedený pokus autorů Liu et al., publikovaný v roce 2021, byl uskutečněn ve sterilních podmínkách a jeho výsledky odhalily přítomnost endofytických bakterií a mikroorganismů na povrchu kořenů. Autoři této studie dodávají, že není možné určit přesný mechanismus transformace HCH.



Dalším prvkem ovlivňujícím účinnost odstranění mohou být rostlinné exudáty, kdy produkce a složení těchto exudátů může ovlivňovat rhizosférní bakterie, které je využívají jako zdroje nutrientů (Hayat et al. 2017) nebo exudáty mohou ovlivňovat pH prostředí (Singh et al. 2023). Rostlinné exudáty také mohou podporovat desorpci lipofilních polutantů z růstového substrátu. Tyto vlastnosti byly prokázány ve studii zaměřené na obohacení půdy kontaminované HCH přirozenými nebo umělými kořenovými exudáty, kdy byla prokázána zvýšená desorpce kontaminantů z půdy, což může ovlivnit biologickou dostupnost a následné degradační procesy (Rodríguez-Garrido et al. 2020). Na základě uvedených výsledků tedy může hrát množství kořenové biomasy, složení a množství exudátů i povrch kořenů zásadní roli při odstraňování HCH. Současně u obou typů kontaminace byla pozorována nejvyšší účinnost u koncentrace $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Koncentrace polutantu je jedním z faktorů, které také ovlivňují remediační účinnost. Tato skutečnost byla popsána ve studii autorů Roy et al. z roku 2023. Závěry studie lze aplikovat i na výsledky předkládaného experimentu, kdy při nízké koncentraci HCH pravděpodobně nedocházelo k aktivaci potřebných degradačních enzymů, zatímco při vysoké koncentraci pesticidu se již projevil negativní efekt na rostliny.

Stanovení HCH v rostlinné biomase

Izomery HCH společně s jejich degradačními produkty byly stanovovány v kořenové a nadzemní části všech rostlin. Získané výsledky pro oba typy chemické expozice, všechny koncentrace i rostlinné druhy jsou uvedené v Tabulce 7.



Tabulka 7: Koncentrace δ -HCH a t-HCH v rostlinné biomase

Rostlinný druh	Koncentrace HCH [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	δ -HCH		t-HCH	
		Kořeny [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Nadzemní část [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Kořeny [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Nadzemní část [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
JE	20	140 $\pm$ 20	66 $\pm$ 2	9.8 $\pm$ 0.2	46 $\pm$ 4
	200	830 $\pm$ 90	408 $\pm$ 26	672 $\pm$ 13	260 $\pm$ 77
	1000	3 600 $\pm$ 210	1 630 $\pm$ 150	4 249 $\pm$ 84	820 $\pm$ 120
TL	20	42 $\pm$ 10	51 $\pm$ 17	3.5 $\pm$ 0.5	20 $\pm$ 4
	200	348 $\pm$ 30	208 $\pm$ 62	382 $\pm$ 13	77 $\pm$ 45
	1000	1 610 $\pm$ 220	459 $\pm$ 98	3 383 $\pm$ 44	451 $\pm$ 63
AG	20	457 $\pm$ 16	29 $\pm$ 6*; 13 $\pm$ 5**	45 $\pm$ 2	32 $\pm$ 13*; 51 $\pm$ 15**
	200	2 099 $\pm$ 13	406 $\pm$ 19*; 33 $\pm$ 2**	1 129 $\pm$ 30	145 $\pm$ 45*; 227 $\pm$ 9**
	1000	12 500 $\pm$ 1500	2 070 $\pm$ 540*; 69 $\pm$ 11**	12 382 $\pm$ 315	1 475 $\pm$ 108*; 577 $\pm$ 26**
PA	20	79 $\pm$ 15	119 $\pm$ 5	8.9 $\pm$ 0.5	101 $\pm$ 24
	200	648 $\pm$ 25	760 $\pm$ 85	989 $\pm$ 70	210 $\pm$ 70
	1000	3 170 $\pm$ 280	1 900 $\pm$ 230	5 171 $\pm$ 179	820 $\pm$ 119

* hodnoty HCH pro stonky; **hodnoty HCH pro listovou část

Výsledky ukazují, že příjem izomerů HCH je závislý na aplikované dávce - čím vyšší dávka pesticidu byla aplikována, tím vyšší koncentrace byly nalezeny v kořenové i nadzemní tkáni rostlin. Sestupné pořadí rostlinných druhů dle koncentrace HCH bylo následující: olše > sítina > rákos > orobinec pro δ izomer; olše > rákos > sítina > orobinec pro t-HCH. V případě expozice rostlin δ izomeru byly zaznamenány také izomery α -HCH, β HCH a γ -HCH. Tyto izomery byly zjištěny u všech druhů rostlin při dvou nejvyšších expozičních koncentracích v rozmezí 0,01 - 0,10 % α -HCH, 0,3 - 6,1 % β HCH, 0,01 - 0,08 % γ -HCH aplikované dávky. Významněji byl zastoupen β HCH, který dokonce vykazoval koncentrační trend v závislosti na aplikované dávce. Pro vyloučení falešně pozitivních výsledků byly analyzovány zásobní roztoky pesticidů používaných během experimentu. Současně byly vzorky δ -HCH zpracovávány jako první a vždy od nejnižší expoziční koncentrace po nejvyšší. Materiál obsahující t-HCH byl zpracováván odděleně, aby se zabránilo přenosu izomerů mezi jednotlivými skupinami.



V analytické části byly použity vnitřní kontroly a blanky pro ověření, že během analýzy nedochází k přenosu sledovaných látek mezi analýzami (tzv. carryover). S vysokou pravděpodobností zde tedy dochází k transizomerizaci δ -HCH, přičemž však experimentální provedení neumožňuje stanovit přesný bod, kde dochází k této transizomeraci.

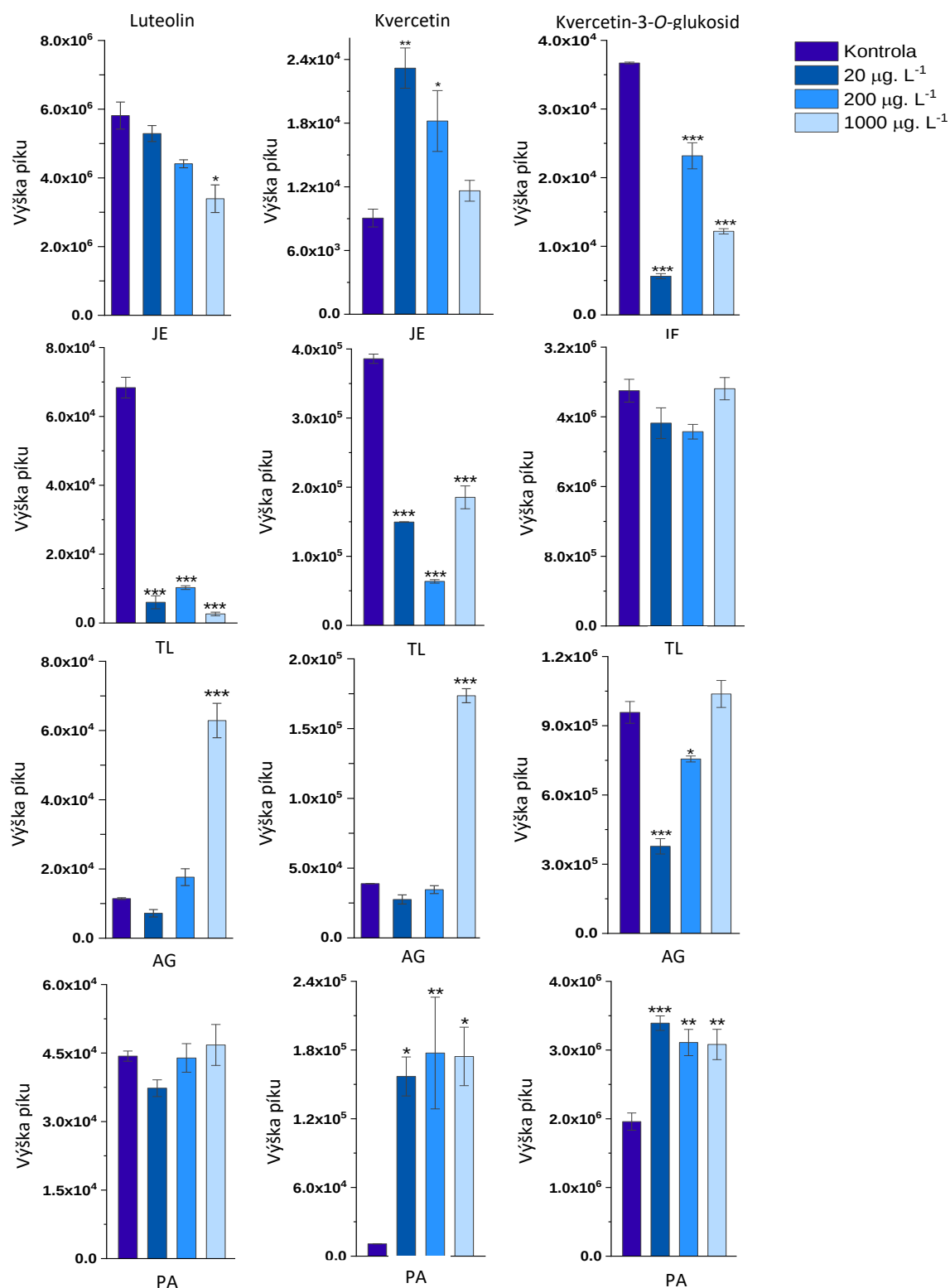
Na rozdíl od růstového substrátu, byly v kořenech zaznamenány degradační produkty HCH (1,3-diCIB). Přítomnost metabolitu ukazuje, že HCH mohly být v rhizosféře degradovány rhizosférní mikrobiotou (Cuozzo et al. 2018) v možné interakci s rostlinnými exudáty a následně přijímány rostlinami. Alternativně by k degradaci HCH a tvorbě CIB mohlo docházet přímo v biomase kořenů. V případě kořenové tkáně rostlin ve skupině exponované t-HCH nebyl pozorován výrazný preferenční příjem určitých izomerů. Přesto bylo zaznamenáno, že u nižších expozičních koncentrací byla v kořenech vyšší koncentrace δ -HCH a β -HCH. Zvýšené množství δ -HCH lze odůvodnit jeho vysokou lipofilitou (ATSDR 2005) a tedy přednostní vazbu na lipidovou vrstvu kořene (Burken a Schnoor 1998). Zvýšená akumulace β izomeru byla již dříve pozorována u jiných rostlinných druhů a je přisuzována hydrofóbnímu rozdělení mezi povrch kořene a vodný roztok pesticidu (Calvelo Pereira et al. 2006; Mamirova et al. 2021). Analýza nadzemní části rostlin potvrdila transport HCH transpiračním proudem, přičemž stanovené koncentrace byly ve většině případů nižší, než v kořenové tkáni. V nadzemních částech rostlin byly zaznamenány především izomery α -HCH a δ -HCH. Analyzovány byly i kontrolní skupiny rostlin (bez expozice HCH) pro vyloučení kontaminace prostřednictvím cirkulace vzduchu, odpaření HCH a jeho znovu nasorbováním na listové plochy rostlin. Izomery α -HCH a δ -HCH mají podobné fyzikální vlastnosti, konkrétně tenzi par, která je zodpovědná za translokaci látek do nadzemních částí rostlin (Balázs et al. 2018; Chaudhry et al. 2002). Tyto závěry korespondují s dříve publikovanými výsledky studie biotransformace α -HCH a β -HCH v pšenici (Liu et al. 2021). Nadzemní části všech druhů rostlin obsahovaly 1,3-diCIB. Jelikož bylo možné u olší analyzovat stonky a listy zvlášť, bylo možné pozorovat vysoké koncentrace 1,3-diCIB ve stoncích a naopak nízké koncentrace v listech. Tento trend lze vysvětlit transpirací rostlin a postupnou volatilizací degradačního produktu z listové plochy. Současně bylo pozorováno, že nejvyšší koncentrace 1,3-diCIB byly pozorovány ve skupinách vystavených koncentraci $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ původní dávky HCH. Lze tedy předpokládat, že při této úrovni kontaminace dochází k nejvyšší degradaci HCH.



Necílová analýza - důsledky přítomnosti HCH

Necílová analýza byla provedena v rostlinném materiálu s cílem monitorovat změny v sekundárním metabolismu vybraných rostlinných druhů a metabolismus HCH po expozici t-HCH. Tento typ ošetření byl vybrán z důvodu, že ve většině případů se v prostředí nevyskytuje kontaminace pouze jedním izomerem, ale většinou je přítomna jejich směs. Rostlinný materiál pro tuto analýzu byl zpracován a analyzován metodami popsány v kapitole 4.1.2 Necílová analýza.

Výsledky této analýzy ukazují jasnou diferenciaci v produktech sekundárního metabolismu mezi kontrolní a ošetřenou skupinou u olší a sítiny. V případě rákosu a orobince je tato diferenciaci neúplná. U všech studovaných druhů rostlin byla navíc zjištěna vysoká kvalitativní rozmanitost polyfenolů. Byly identifikovány sloučeniny jako kyselina chlorogenová, neochlorogenová a ferulová. Dalšími významnými zástupci byly flavonoidy (kvercetin, kvercitrin, dihydrokvercetin, luteolin, naringenin, genistein, orientin, astragalin a myricetin), třísloviny, triterpenoidy (kyselina betulínová a betulín), dihydrochalkon (chlorizin) a fenolové diterpeny (karnosol a kyselina karnosová). Luteolin, kvercetin a kvercetin-3-O-glukosid byly nalezeny u všech analyzovaných druhů rostlin. Změny v relativním zastoupení těchto látek jsou znázorněny na Obrázku 22. Luteolin byl v nejhojnějším množství u sítiny a méně u ostatních zkoumaných druhů. Naopak kvercetin a jeho glukosid byly u tohoto rostlinného druhu zastoupeny v nejmenším množství ve srovnání s ostatními druhy, ale obsah kvercetinu byl oproti kontrole zvýšen. Předchozí studie naznačují, že volný kvercetin má vyšší antioxidační aktivitu díky přítomnosti 3-OH skupiny, která v tomto procesu zřejmě hraje významnou roli (Batiha et al. 2020), protože působení HCH či jeho degradačních produktů vede ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (Faure et al. 2012; Miguel et al. 2012; Liu et al. 2005; Sinha 2002). Za předpokladu, že rostliny syntetizují vyšší množství flavonoidů jako nástroj kompenzace oxidačního stresu a jejich vyšší množství dává rostlině šanci přizpůsobit se chemickému stresu, pak by bylo vhodné tyto druhy vybrat pro kontaminované oblasti. Na základě získaných údajů popisujících množství flavonoidů a jejich změny v případě expozice t-HCH se jako vhodní kandidáti jeví rákos obecný a olše lepkavá. Je však třeba zdůraznit, že sekundární metabolismus rostlin je velmi různorodý a často druhově specifický. Sloučeniny nalezené u všech studovaných druhů reagujících na t-HCH sice nemusí být nejvhodnějšími markery chemického stresu, ale mohou poskytnout prvotní informace týkající se metabolických změn.



Obrázek 22: Změny výšky píku vybraných flavonoidů u všech rostlinných druhů v závislosti na koncentraci *t*-HCH; Statistické hodnocení změn polyfenolů vyvolaných HCH ve srovnání s neošetřenou kontrolou: jednosměrná ANOVA, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



Detekce metabolitů HCH

Hlavními metabolity odvozenými od HCH jsou CIB a chlorfenoly (CIP). CIB jsou analyty stanovené pomocí zavedené cílené GC/MS metody společně s HCH. Pro CIP nebyla zavedena cílová analýza a proto byla jejich přítomnost hodnocena pomocí necílové analýzy. Tato skupina sloučenin podléhá v rostlinném metabolismu konjugaci s glukózou pomocí O-glukosyltransferáz za vzniku β -O-glukosidů. Vzniklé glukosidy dále podléhají malonylaci v přítomnosti malonyl CoA aktivitou malonyl-CoA transferázy (Petroutsos et al. 2007; Sandermann 1992). Na základě těchto predikcí byly vypočítány hodnoty hmotnost/náboj pro mono-CIP, di-CIP, tri-CIP, tetra-CIP a penta-CIP a jejich konjugáty s glukózou nebo s glukózou a malonylem. Hodnoty m/z byly hledány v pozitivním i negativním módu LC/MS analýzy a přítomnost a počet molekul chlóru byly ověřeny na základě izotopového poměru $^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl}$ (3:1). První nalezená sloučenina byla dichlorfenyl- β -D-glukopyranosid (DCPG), která se vyskytovala především ve vzorcích olší. U této sloučeniny byla pozorována závislost mezi aplikovanou dávkou t-HCH a nárůstem intenzity odezvy těchto iontů v TOF/MS záznamu. K detekci produktových iontů byla použita tzv. SWATH akvizice. Porovnáním MS/MS spekter kontrolních a ošetřených vzorků byly nalezeny produktové ionty o molekulové hmotnosti 163 a 149, které zřejmě pocházejí ze sledovaného DCPG. Produktový iont 163 byl následně ověřen pomocí literatury (Day a Saunders 2004). Analýza vzorků dále ukázala možnou přítomnost monochlorfenyl- β -D-(6-O-malonyl) glukopyranosidu (MCPGM) s m/z 376. Zdá se tedy, že aplikované HCH jsou rostlinami metabolizovány a degradovány na DCPG a na MCPGM, přičemž tvorba malonylglykosidu naznačuje následnou sekvestraci těchto sloučenin do vakuol či buněčné stěny. Ostatní hledané produkty konjugační fáze metabolismu nebyly detekovány. Možnými příčinami mohou být jejich nízké koncentrace či například přítomnost výrazných matričních efektů, které zabránily jejich identifikaci. Lze tedy jen přepokládat, že u DCPG dochází k následné malonylaci, tak jak bylo dříve prokázáno ve studii autorů Petroutsos et al. z roku 2008, případně je možné, že nejprve dochází k odštěpení chlóru z DCPG za vzniku monochlorfenyl- β -D-glukopyranosidu, který je následně konjugován s malonylem na detekovaný MCPGM.



4.2.4.2 Závěry studie

Z výsledků provedené studie vyplývá řada závěrů. Byla potvrzena pozitivní role všech druhů rostlin v případě odstranění HCH, přičemž účinnost je závislá na aplikované dávce polutantu a typu kontaminace. Pro lokality s vysokou úrovní kontaminace nebo kombinací chemických látek by bylo vhodné zvolit kombinované sanační metody. Výběr rostlinných druhů také závisí na uspořádání remediačního systému a tento výběr se tedy bude lišit pro mokřadní systémy (orobínek, rákos a síťina) a kontaminovanou půdu (olše). Z předložených zjištění lze vyvodit závěr, že síťina je vhodná pro mokřadní systémy vzhledem k vysoké účinnosti remediace pro δ -HCH i t -HCH. Ovšem monokulturní porosty jsou nevhodné kvůli snížené odolnosti vůči predátorům nebo snadnému šíření chorob (Liang et al. 2011). Proto je vhodnější instalovat systém obsahující více rostlinných druhů, aby se zvýšila udržitelnost a biologická rozmanitost systému. Olše mohou nalézt uplatnění v sanaci kontaminovaných půd, případně lze využít pro fytoscreening s cílem monitorovat rozsah kontaminace podzemních vod a/nebo sledovat pohyb kontaminačního mraku. V mokřadních systémech by mohly olše nalézt uplatnění v případě „*short rotation coppice culture*“ s pravidelně narušovaným kořenovým systémem. Analýza produktů sekundárního metabolismu rostlin ukázala na kvantitativní změny sloučenin s antioxidačními vlastnostmi v důsledku oxidačního stresu vyvolaného HCH. Navzdory vysoké variabilitě bylo možné u všech druhů nalézt sloučeniny, které mohou být užitečné jako indikátory odolnosti vůči stresu.

Současně byl prostřednictvím necílové analýzy zaznamenán aktivní metabolismus HCH. Toto zjištění může být užitečné pro lepší pochopení osudu HCH v rostlinné tkáni s využitím v bioremediačních technologiích.

Tato studie byla zveřejněna v časopise Science of the Total Environment - Vrchovská, S., Amirbekov A., Sázavská, T., Arias, C. A., Jespersen, E. A., Černík M. a Hrabák, P. 2024. Chemical analysis of wetland plants to evaluate the bioaccumulation and metabolism of hexachlorocyclohexane (HCH). Science of The Total Environment [online]. **921**, 171141. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2024.171141



5. Indikátory hodnocení akumulace a transportu HCH

Pro částečné porovnání vlivů jednotlivých vlastností na bioakumulaci HCH byl proveden výpočet kořenového koncentračního faktoru (RCF), translokačního faktoru (TF) a biokoncentračního faktoru (BCF). Tyto parametry popisují schopnosti daných rostlinných druhů za daných podmínek akumulovat studované chemické látky v kořenové tkáni (RCF), transport a distribuci sledovaných látek v rostlině (TF) a akumulaci látek v celkové biomase v porovnání s okolním prostředím. RCF je stanoven jako podíl mezi koncentracemi dané chemické látky v kořenech příslušných rostlin a v růstovém substrátu (Kang et al. 2010), TF je koncentrační poměr mezi naměřenými hodnotami pesticidu v nadzemní části rostliny a v kořenové tkáni (Wang et al. 2021b) a BCF je stanoven jako poměr koncentrací pesticidu v rostlině ke koncentraci pesticidu v růstovém substrátu (Wang et al. 2021a). Hodnoty pro jednotlivé indikátory byly vypočteny dle následujících rovnic:

$$RCF = C_{\text{kořenová část}} / C_{\text{substrát}}$$

$$BCF = C_{\text{celá rostlina}} / C_{\text{substrát}}$$

$$TF = C_{\text{nadzemní část}} / C_{\text{kořenová část}}$$

c = koncentrace sledovaných pesticidů v substrátu ($C_{\text{substrát}}$), kořenové ($C_{\text{kořenová část}}$) i nadzemní části rostliny ($C_{\text{nadzemní část}}$) a v celé rostlině ($C_{\text{celá rostlina}}$) v $\mu\text{g}\cdot\text{g}$ sušiny

Výsledky pro uvedené tři parametry pro jednotlivé experimentální varianty týkající se olše lepkavé, jsou uvedeny v Tabulce 8.



Tabulka 8: Hodnoty RCF, TF a BCF pro olši lepkavou

Sledovaný parametr	Charakteristika	RCF	TF	BCF
Potomstvo mateřského genotypu (2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ aplikovaného pesticidu)	Valtěřov	Nelze určit	Nelze určit	3,54
	Bečva	Nelze určit	Nelze určit	3,80
	Lásenice	Nelze určit	Nelze určit	2,76
	Tuřany	Nelze určit	Nelze určit	1,22
	Tloskov	Nelze určit	Nelze určit	4,82
	Březové	Nelze určit	Nelze určit	1,04
Stáří rostliny (2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ aplikovaného pesticidu)	Jednoleté sazenice	7,46	0,119*	8,34
	Dvouleté sazenice	11,62	0,002*	11,64
Seříznutí rostliny (2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ aplikovaného pesticidu)	Jednoleté sazenice seříznuté	11,19	0,113*	12,45
	Dvouleté sazenice seříznuté	4,74	0,022*	4,84
Izomerie HCH (50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ aplikovaného pesticidu)	α -HCH	0,0007	0,127	0,002
	β -HCH	0,0002	0,062	0,0004
	δ -HCH	0,01	0,016	0,006
Koncentrace δ -HCH	20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	34,98	2,452	38,45
	200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	18,89	0,007	20,55
	1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10,93	0,001	5,31

*TF stanoven z koncentrací HCH ve větvičkách

Získané výsledky poukazují na závislost BCF na vývojovém stádiu rostlin - s rostoucím stářím rostliny roste i BCF (tříměsíční sazenice: 1,04 - 4,82; jednoleté sazenice: 8,34 a dvouleté sazenice: 11,64). Závislost na vývojovém stádiu byla prokázána i u jiných rostlinných druhů ve vztahu k pesticidům (Namiki 2022). V této studii se autoři také zabývali podmínkami prostředí (teplota či délka dne) a vlivu těchto parametrů na RCF. RCF je dále ovlivněn izomerií HCH a koncentrací polutantu. Je patrné, že se zvyšující se koncentrací δ -HCH dochází k saturaci kořenové tkáně pro tento isomer a současně je zde snížena jeho translokace do vyšších částí rostlin. Odpovídající trend byl pozorován i u BCF, které klesá zvyšující se koncentrací HCH v substrátu. Obdobné koncentrační závislosti byly pozorovány i u ostatních rostlinných druhů. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 9.



Tabulka 9: Porovnání rostlinných druhů při expozici δ -HCH

Rostlinný druh	Koncentrace polutantu δ -HCH	RCF	TF	BCF
JE	20	8,94	2,02	10,96
	200	5,82	0,18	6,87
	1000	4,27	0,17	5,01
TL	20	3,64	1,05	4,49
	200	2,11	0,19	2,52
	1000	1,91	0,08	2,06
AG	20	34,98	2,45	38,45
	200	18,89	0,007	20,55
	1000	10,93	0,007	5,31
PA	20	5,71	2,97	8,68
	200	3,91	0,34	5,24
	1000	2,68	0,18	3,18

Tabulka 10 zahrnuje porovnání sledovaných parametrů u jednotlivých druhů po expozici t-HCH. V porovnání s výsledky z Tabulky 9 je patrné, že hodnoty sledovaných akumulčních a translokačních faktorů jsou nižší než v případě expozice δ -HCH. Zaznamenán byl však opačný trend závislosti sledovaných faktorů na koncentraci aplikovaného pesticidu. Hodnoty RCF i BCF rostly se zvyšující se koncentrací aplikované technické směsi izomerů ale současně jejich absolutní hodnoty byly oproti hodnotám v Tabulce 9 výrazněji sníženy. Toto snížení může být důsledkem nedosažené saturace systému, protože se jednalo o směs izomerů a nikoliv o čistou látku. TF vykazoval stejné chování jako v případě působení samotného δ izomeru.



Tabulka 10: Porovnání rostlinných druhů při expozici t-HCH

Rostlinný druh	Koncentrace polutantu t-HCH	RCF	TF	BCF
JE	20	0,30	1,41	1,71
	200	2,02	0,39	2,80
	1000	3,02	0,19	3,60
TL	20	0,07	0,41	0,48
	200	1,01	0,20	1,22
	1000	2,37	0,13	2,69
AG	20	1,12	1,26	3,17
	200	6,12	0,20	8,15
	1000	11,35	0,05	13,23
PA	20	0,17	0,59	0,76
	200	2,89	0,21	3,51
	1000	2,69	0,16	3,12

6. Shrnutí disertační práce

V předložené disertační práci byla optimalizována a validována metoda pro stanovení vybraných rostlinných hormonů v rostlinné biomase společně se zavedením metody pro necílovou analýzu. Tyto analytické metody byly společně s metodami pro stanovení HCH a CIB použity během čtyř experimentů zaměřených na sledování vztahu mezi HCH a rostlinami v kontextu fytořemediace. Provedené studie sledovaly vlivy různých vlastností vybraných rostlinných druhů, izomeru HCH či koncentrace polutantu na remediační účinnost systému společně s rostlinnými primárními i sekundárními metabolity jako prostředky pro sledování adaptace rostlin na stresové podmínky. Hodnoceny byly i vybrané indikátory sloužící pro posouzení akumulace a transportu HCH v závislosti na měnících se experimentálních podmínkách.



7. Závěr disertační práce

Fytoremediace je rozsáhlá a rozmanitá oblast, ve které figuruje řada proměnných elementů, které mohou mít vliv na účinnost a udržitelnost remediačního systému. Současně je složité hodnotit jednotlivé parametry jako je vhodnost daných rostlinných druhů, vliv mikroorganismů, typu a koncentrace chemické sloučeniny či remediačního uspořádání na účinnost odstranění daného polutantu vzhledem k provázanosti jednotlivých prvků.

Na základě provedených experimentů je patrné, že olše lepkavá disponuje potenciálem v případě remediace HCH. Olše působí v remediačním systému jako akcelerátor odstranění HCH prostřednictvím podpory rhizosférických mikroorganismů a zprostředkovatel fytovolatilizace. Bylo prokázáno, že HCH ovlivňuje germinaci olší s odlišnou genetickou výbavou, přičemž v některých případech může tento pesticid dokonce podpořit klíčení a vývoj rostliny. Pro remediační systémy s opakovaným sklízením biomasy je vhodnější využití jednoletých rostlin, které i po sklizení nadzemní části vykazují účinné odstranění HCH.

Dále bylo zjištěno, že účinek HCH na hormonální profil olší vede k adaptaci rostliny na tento stresový stimul, což ovlivňuje hormonální signalizaci prostřednictvím ABA, SA a JA. Tato signalizace však není ovlivněna izomerií HCH. Tyto jevy poukazují na potenciál těchto rostlin pro adaptaci na přítomnost chemických látek. Přesto však využití hormonálních sloučenin jako markerů kontaminace není vhodné z důvodu snadné ovlivnitelnosti jejich kvalitativních i kvantitativních parametrů environmentálními podmínkami.

Provedením experimentu s různými rostlinnými druhy byla potvrzena odlišnost v příjmu HCH a jeho odstranění, přičemž kromě olše lepkavá poskytovala nejlepší výsledky sítina rozkladitá. Izomerie a koncentrace pesticidu také ovlivňují remediační účinnost, příjem HCH, jeho akumulaci v kořenové části rostlin a následný transport do nadzemních částí. Necílová analýza sekundárního metabolismu u sledovaných rostlinných druhů ukázala, že organochlorované pesticidy ovlivňují produkci polyfenolů, jako jsou luteolin, kvercetin a kvercetin-3-O-glukosid, které pomáhají rostlinám kompenzovat oxidační stres. Pomocí necílové analýzy byl také prokázán aktivní metabolismus HCH na transformační produkty dichlorfenyl- β -D-glukopyranosid a monochlorfenyl- β -D-(6-O-malonyl) glukopyranosid.



8. Další směr vývoje

Experimentální testy představené v této disertační práci generují řadu dalších oblastí a námětů pro další studium. Jedná se především o sledování volatilizace HCH jako podstatný parametr remediační účinnosti, vliv množství organického uhlíku, procentuální zastoupení jílu či obsahu vody v růstovém substrátu na dostupnost sledovaných pesticidů pro příjem kořenovým systémem a na metabolické transformace prostřednictvím půdních mikroorganismů.

V současné době je zvýšené povědomí o problematice kontaminace podzemních vod chemickými látkami, přičemž se nejedná pouze o pesticidy ze starých ekologických zátěží ale jedná se i o moderní, stále hojně využívané chemické látky - moderní pesticidy aplikované v zemědělství a degradační produkty těchto pesticidů, které mohou být toxičtější a více perzistentní než původní sloučeniny. Kontaminace vodních zdrojů těmito látkami neumožňuje jejich následovné využití ve vodárenském průmyslu a vzhledem k finanční náročnosti čistících metod je vhodné kontaminaci zdrojů podzemní vody předcházet nebo ji v rané fázi detekovat a to například využitím fytoscreeningu v ochranných pásmech vodních zdrojů. Různorodost chemických sloučenin klade vysoké nároky na citlivé analytické metody se širokým spektrem sledovaných látek, takže postupné zavádění analytických metod pro multiscreeningové analýzy je klíčovým prvkem pro hodnocení intenzity znečištění životního prostředí.



9. Seznam použité literatury

- ABHILASH, P. C. a Nandita SINGH, 2009. Pesticide use and application: An Indian scenario. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **165**(1), 1–12. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2008.10.061
- AHARONI, Asaph a Gad GALILI, 2011. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **22**(2), Food biotechnology – Plant biotechnology, 239–244. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2010.11.004
- AL-ALI, Ameen, Jovana DRAVEL, François KRIER, Max BÉCHET, Marc ONGENA a Philippe JACQUES, 2018. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **25**(30), 29910–29920. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-0469-1
- ALI, Hazrat, Ezzat KHAN a Muhammad Anwar SAJAD, 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* [online]. **91**(7), 869–881. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075
- AMIRBEKOV, Aday, Martina STROJSOVA, Jan NEMECEK, Jakub RIHA, Pavel HRABAK, Carlos ARIAS, Alena SEVCU a Miroslav ČERNÍK, 2023. Biodiversity in wetland+ system: a passive solution for HCH dump effluents. *Water Science and Technology* [online]. **88**(12), 3095–3109. ISSN 0273-1223. Dostupné z: doi:10.2166/wst.2023.395
- AMIRBEKOV, Aday, Stanislava VRCHOVECKA, Jakub RIHA, Ivan PETRIK, David FRIEDECKY, Ondřej NOVAK, Miroslav ČERNÍK, Pavel HRABAK a Alena SEVCU, 2024. Assessing HCH isomer uptake in *Alnus glutinosa*: implications for phytoremediation and microbial response. *Scientific Reports* [online]. **14**(1), 4187. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-024-54235-1
- AMPOFO, Justice Agyei, 2022. Remediation Technologies for Polluted Sites: Review. *Journal of Environment and Earth Science*. **12**(12), 5. ISSN 2225-0948.
- ANDERSON, Jonathan P., Ellet BADRUZSAUFARI, Peer M. SCHENK, John M. MANNERS, Olivia J. DESMOND, Christina EHLERT, Donald J. MACLEAN, Paul R. EBERT a Kemal KAZAN, 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* [online]. **16**(12), 3460–3479. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.104.025833
- ARTHUR, Ellen L., Pamela J. RICE, Patricia J. RICE, Todd A. ANDERSON, Sadika M. BALADI, Keri L. D. HENDERSON a Joel R. COATS, 2005. Phytoremediation—An Overview. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. **24**(2), 109–122. ISSN 0735-2689. Dostupné z: doi:10.1080/07352680590952496



ATSDR, 2005. *Toxicological profile for Hexachlorocyclohexane*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. [online]. B.m.: Atlanta [vid. 2021-05-26]. ISBN 978-1-4200-6188-8. Dostupné z: doi:10.1201/9781420061888

BAHARUDIN, Nur Farhana a Nurul Izzati OSMAN, 2023. Plant development, stress responses, and secondary metabolism under ethylene regulation. *Plant Stress* [online]. **7**, 100146. ISSN 2667-064X. Dostupné z: doi:10.1016/j.stress.2023.100146

BALÁZS, Helga E., Christoph A. O. SCHMID, Ioana FEHER, Dorina PODAR, Paul-Marian SZATMARI, Olivian MARINCAȘ, Zoltan R. BALÁZS a Peter SCHRÖDER, 2018. HCH phytoremediation potential of native plant species from a contaminated urban site in Turda, Romania. *Journal of Environmental Management* [online]. **223**, 286–296. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2018.06.018

BATIHA, Gaber El-Saber, Amany Magdy BESHBIHY, Muhammad IKRAM, Zohair S. MULLA, Mohamed E. Abd EL-HACK, Ayman E. TAHA, Abdelazeem M. ALGAMMAL a Yaser Hosny Ali ELEWA, 2020. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods* [online]. **9**(3), 374. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods9030374

BECERRA-CASTRO, Cristina, Petra S. KIDD, Beatriz RODRÍGUEZ-GARRIDO, Carmela MONTERROSO, Paula SANTOS-UCHA a Ángeles PRIETO-FERNÁNDEZ, 2013. Phytoremediation of hexachlorocyclohexane (HCH)-contaminated soils using *Cytisus striatus* and bacterial inoculants in soils with distinct organic matter content. *Environmental Pollution* [online]. **178**, 202–210. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2013.03.027

BIANCONI, Daniele, D. PAOLIS, Ana AGNELLO, D. LIPPI, Fabrizio PIETRINI, Massimo ZACCHINI, Chiara POLCARO, Enrica DONATI, Pierluigi PARIS a Angelo MASSACCI, 2011. Field-Scale rhizoremediation of a contaminated soil with hexachlorocyclohexane (HCH) isomers: The potential of poplars for environmental restoration and economical sustainability. In: *Handbook of Phytoremediation*. ISBN 978-1-61728-753-4.

BLECHERT, S., W. BRODSCHELM, S. HÖLDER, L. KAMMERER, T. M. KUTCHAN, M. J. MUELLER, Z. Q. XIA a M. H. ZENK, 1995. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **92**(10), 4099–4105. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.92.10.4099

BOLAND, Wilhelm, Jörn HOPKE, Jens DONATH, Jörg NÜSKE a Friedemann BUBLITZ, 1995. Jasmonic Acid and Coronatin Induce Odor Production in Plants. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. **34**(15), 1600–1602. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.199516001

BOYLE, Alfred W., Max M. HÄGGBLOM a Lily Y. YOUNG, 1999. Dehalogenation of lindane (γ-hexachlorocyclohexane) by anaerobic bacteria from marine sediments and by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. **29**(4), 379–387. ISSN 0168-6496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00628.x

BRANKOVIĆ, Snežana, Radmila GLIŠIĆ, Marina TOPUZOVIĆ, Vera ĐEKIĆ a Marija MARIN, 2018. The Bioaccumulation and Translocation Potential of Some Aquatic Plants.



In: *Water Research and Management* [online]. B.m.: Serbian Water Pollution Control Society, Belgrade (Serbia) [vid. 2021-11-07]. Dostupné z: https://www.wrmjournal.com/images/stories/casopis/No_30/03.pdf

BRIX, Hans, 1994. Functions of Macrophytes in Constructed Wetlands. *Water Science and Technology* [online]. **29**, 71–78. Dostupné z: doi:10.2166/wst.1994.0160

BURKEN, Joel G. a Jerald L. SCHNOOR, 1998. Predictive Relationships for Uptake of Organic Contaminants by Hybrid Poplar Trees. *Environmental Science & Technology* [online]. **32**(21), 3379–3385. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es9706817

BURKEN, Joel, Don VROBLESKY a Jean BALOUET, 2011. Phytoforensics, Dendrochemistry, and Phytoscreening: New Green Tools for Delineating Contaminants from Past and Present. *Environmental science & technology* [online]. **45**, 6218–6226. Dostupné z: doi:10.1021/es2005286

BUSER, H. R. a M. D. MUELLER, 1995. Isomer and Enantioselective Degradation of Hexachlorocyclohexane Isomers in Sewage Sludge under Anaerobic Conditions. *Environmental Science & Technology* [online]. **29**(3), 664–672. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es00003a013

CALVELO PEREIRA, R., M. CAMPS-ARBESTAIN, B. RODRÍGUEZ GARRIDO, F. MACÍAS a C. MONTERROSO, 2006. Behaviour of α -, β -, γ -, and δ -hexachlorocyclohexane in the soil–plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution* [online]. **144**(1), Soil and Sediment Remediation (SSR), 210–217. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2005.12.030

CALVELO PEREIRA, R., C. MONTERROSO a F. MACÍAS, 2010. Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere* [online]. **79**(3), 326–333. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2010.01.035

CARRINGTON, Yuriko, Jia GUO, Cuong H. LE, Alexander FILLO, Junsu KWON, Lan T. TRAN a Jürgen EHLTING, 2018. Evolution of a secondary metabolic pathway from primary metabolism: shikimate and quinate biosynthesis in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* [online]. ISSN 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.13990

CLAESSENS, Hugues, A. OOSTERBAAN, Peter SAVILL a Jacques RONDEUX, 2010. A review of the characteristics of Black Alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry* **83** (2010) 2 [online]. **83**. Dostupné z: doi:10.1093/forestry/cpp038

CUOZZO, S. A., P. E. SINELI, J. DAVILA COSTA a G. TORTELLA, 2018. *Streptomyces* sp. is a powerful biotechnological tool for the biodegradation of HCH isomers: biochemical and molecular basis. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. **38**(5), 719–728. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.1080/07388551.2017.1398133

ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., GREGOROVÁ, B. a MRÁZKOVÁ, M, 2010. *Onemocnění olší způsobené druhem Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk Identifikace choroby, odběr vzorků [online]. 2010. B.m.: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i.



Dostupné z: https://www.vukoz.cz/wp-content/uploads/doc/Cerny-et-al-2010_Onemocneni-olsi-zpusobene-druhem-Phytophthora-alni_Identifikace-choroby.pdf

DAVIÈRE, Jean-Michel a Patrick ACHARD, 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development* [online]. **140**(6), 1147–1151. ISSN 1477-9129, 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.087650

DAVIES, Peter J., 2010. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Peter J. DAVIES, ed. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 1–15 [vid. 2019-12-09]. ISBN 978-1-4020-2686-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-2686-7_1

DAY, James A. a F. Michael SAUNDERS, 2004. Glycosidation of chlorophenols by *Lemna minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. **23**(3), 613–620. ISSN 1552-8618. Dostupné z: doi:10.1897/02-649

DE KORT, Hanne, Katrien VANDEPITTE, Hans Henrik BRUUN, Déborah CLOSSET-KOPP, Olivier HONNAY a Joachim MERGEAY, 2014. Landscape genomics and a common garden trial reveal adaptive differentiation to temperature across Europe in the tree species *Alnus glutinosa*. *Molecular Ecology* [online]. **23**(19), 4709–4721. ISSN 1365-294X. Dostupné z: doi:10.1111/mec.12813

DE LA TORRE-GONZÁLEZ, Alejandro, Eloy NAVARRO-LEÓN, Alfonso ALBACETE, Begoña BLASCO a Juan M. RUIZ, 2017. Study of phytohormone profile and oxidative metabolism as key process to identification of salinity response in tomato commercial genotypes. *Journal of Plant Physiology* [online]. **216**, 164–173. ISSN 0176-1617. Dostupné z: doi:10.1016/j.jplph.2017.05.016

DE VOS, Ric CH, Sofia MOCO, Arjen LOMMEN, Joost JB KEURENTJES, Raoul J BINO a Robert D HALL, 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols* [online]. **2**(4), 778–791. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.95

DEMPSEY, D'Maris Amick a Daniel F. KLESSIG, 2017. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology* [online]. **15**(1), 23. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/s12915-017-0364-8

DEMPSEY, D'Maris Amick, A. Corina VLOT, Mary C. WILDERMUTH a Daniel F. KLESSIG, 2011. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* [online]. **9**, e0156. ISSN 1543-8120. Dostupné z: doi:10.1199/tab.0156

DEPTUŁA, Miłosz, Agnieszka PIERNIK, Andrzej NIENARTOWICZ, Piotr HULISZ a Dariusz KAMIŃSKI, 2020. *Alnus glutinosa* L. Gaertn. as potential tree for brackish and saline habitats. *Global Ecology and Conservation* [online]. **22**, Article e00977. ISSN 2351-9894. Dostupné z: doi:10.1016/j.gecco.2020.e00977

DHALIWAL, Salwinder Singh, Jaswinder SINGH, Parminder Kaur TANEJA a Agniva MANDAL, 2020. Remediation techniques for removal of heavy metals from the soil contaminated through different sources: a review. *Environmental Science and Pollution*



Research [online]. **27**(2), 1319–1333. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-019-06967-1

DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia, Jean-Pierre BOURGUIGNON, Linda C. GIUDICE, Russ HAUSER, Gail S. PRINS, Ana M. SOTO, R. Thomas ZOELLER a Andrea C. GORE, 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* [online]. **30**(4), 293–342. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2009-0002

DILWORTH, L. L., C. K. RILEY a D. K. STENNETT, 2017. Chapter 5 - Plant Constituents: Carbohydrates, Oils, Resins, Balsams, and Plant Hormones. In: Simone BADAL a Rupika DELGODA, ed. *Pharmacognosy* [online]. Boston: Academic Press, s. 61–80 [vid. 2019-12-09]. ISBN 978-0-12-802104-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00005-6

DOBREV, P. I., L. HAVLÍČEK, M. VÁGNER, J. MALBECK a M. KAMÍNEK, 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. **1075**(1), 159–166. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.02.091

DONG, Haoran, Guangming ZENG, Lin TANG, Changzheng FAN, Chang ZHANG, Xiaoxiao HE a Yan HE, 2015. An overview on limitations of TiO₂-based particles for photocatalytic degradation of organic pollutants and the corresponding countermeasures. *Water Research* [online]. **79**, 128–146. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2015.04.038

DU, Fuyou, Guihua RUAN a Huawei LIU, 2012. Analytical methods for tracing plant hormones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **403**(1), 55–74. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5623-x

DURRANT, T., Daniele DE RIGO a Giovanni CAUDULLO, 2016. *Alnus glutinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: *European atlas of forest tree species*. B.m.: Luxembourg : Publication Office of the European Union, s. 64–65. ISBN 978-92-79-36740-3.

EL SAYED, Khalid A., 2000. Natural Products as Antiviral Agents. In: ATTA-UR-RAHMAN, ed. *Studies in Natural Products Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, Bioactive Natural Products (Part E), s. 473–572 [vid. 2024-08-28]. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-5995(00)80051-4

FARRAJI, Hossein, Nastaein Q ZAMAN, Ramlah M TAJUDDIN a Hamed FARAJI, 2016. Advantages and disadvantages of phytoremediation: A concise review. *International Journal of Environmental Science and Technology*. (2), 69–75.

FATMA, Firdos, Aisha KAMAL a Alka SRIVASTAVA, 2018. Exogenous Application of Salicylic Acid Mitigates the Toxic Effect of Pesticides in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **37**(4), 1185–1194. ISSN 1435-8107. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-018-9819-6

FAURE, Mathieu, Angélique SAN MIGUEL, Patrick RAVANEL a Muriel RAVETON, 2012. Concentration responses to organochlorines in *Phragmites australis*. *Environmental Pollution* [online]. **164**, 188–194. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2012.01.040



FINKELSTEIN, Ruth, 2013. Abscissic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* [online]. **11** [vid. 2019-10-27]. ISSN 1543-8120. Dostupné z: doi:10.1199/tab.0166

GAO, Qing-Ming, Shifeng ZHU, Pradeep KACHROO a Aardra KACHROO, 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* [online]. **6** [vid. 2022-01-20]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00228>

GARCÍA-SALGADO, Sara, David GARCÍA-CASILLAS, Ma. Angeles QUIJANO-NIETO a Ma. Milagros BONILLA-SIMÓN, 2012. Arsenic and Heavy Metal Uptake and Accumulation in Native Plant Species from Soils Polluted by Mining Activities. *Water, Air, & Soil Pollution* [online]. **223**(2), 559–572. ISSN 1573-2932. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-011-0882-x

GEVI, Federica, Giuseppina FANELLI, Lello ZOLLA a Sara RINALDUCCI, 2019. Untargeted Metabolomics of Plant Leaf Tissues. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **1978**, 187–195. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9236-2_12

GOSETTI, Fabio, Eleonora MAZZUCCO, Maria Carla GENNARO a Emilio MARENGO, 2016. Contaminants in water: non-target UHPLC/MS analysis. *Environmental Chemistry Letters* [online]. **14**(1), 51–65. ISSN 1610-3661. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-015-0527-1

GOTELLI, M. J., A. LO BALBO, G. M. CABALLERO a C. A. GOTELLI, 2020. Hexachlorocyclohexane phytoremediation using Eucalyptus dunnii of a contaminated site in Argentina. *International Journal of Phytoremediation* [online]. **22**(11), 1129–1136. ISSN 1522-6514. Dostupné z: doi:10.1080/15226514.2020.1736511

GRUIZ, Katalin, Tamás MEGGYES a Éva FENYVESI, 2019. *Engineering Tools for Environmental Risk Management: 4. Risk Reduction Technologies and Case Studies*. B.m.: CRC Press. ISBN 978-1-317-69741-1.

GUPTA, Vishal, Manoj KUMAR, Harshad BRAHMBHATT, C. R. K. REDDY, Abhiram SETH a Bhavanath JHA, 2011. Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid–liquid microextraction method. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. **49**(11), 1259–1263. ISSN 0981-9428. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2011.08.004

HA, Sukbong, Radomira VANKOVA, Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuo SHINOZAKI a Lam-Son Phan TRAN, 2012. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science* [online]. **17**(3), 172–179. ISSN 1878-4372. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2011.12.005

HAGHNAZAR, Hamed, Kourosh SABBAGH, Karen H. JOHANNESSON, Mojtaba POURAKBAR a Ehsan AGHAYANI, 2023. Phytoremediation capability of Typha latifolia L. to uptake sediment toxic elements in the largest coastal wetland of the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **188**, 114699. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2023.114699



HANNINK, Nerissa K., Susan J. ROSSER a Neil C. BRUCE, 2002. Phytoremediation of Explosives. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. **21**(5), 511–538. ISSN 0735-2689. Dostupné z: doi:10.1080/0735-260291044340

HAYAT, Shamsul, Ahmad FARAZ a Mohammad FAIZAN, 2017. Root Exudates: Composition and Impact on Plant–Microbe Interaction. In: *Biofilms in Plant and Soil Health* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, s. 179–193 [vid. 2024-08-07]. ISBN 978-1-119-24632-9. Dostupné z: doi:10.1002/9781119246329.ch10

HERATH, Indika a Meththika VITHANAGE, 2015. Phytoremediation in Constructed Wetlands. In: Abid Ali ANSARI, Sarvajeet Singh GILL, Ritu GILL, Guy R. LANZA a Lee NEWMAN, ed. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 2* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 243–263 [vid. 2021-11-21]. ISBN 978-3-319-10969-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-10969-5_21

HODGSON, Ernest, ed., 2010. *A textbook of modern toxicology*. 4th ed. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-46206-5.

HRABÁK, Pavel, Vojtěch ANTOŠ, Jiří MIKŠÍČEK, Klára LÍSKOVÁ, Stanisław WACLAWEK a Miroslav ČERNÍK, 2018. Phytoscreening dřevin jako instrument pro indikaci šíření organochlorovaných pesticidů v podzemní vodě. In: *Skládková workshop Liberec-Žitava 2018* [online]. Dostupné z: https://skladky.tul.cz/skladky18/files/Sammelband_Sbornik.pdf

HUANG, Huagang, Ning YU, Lijun WANG, D. K. GUPTA, Zhenli HE, Kai WANG, Zhiqiang ZHU, Xingchu YAN, Tingqiang LI a Xiao-e YANG, 2011. The phytoremediation potential of bioenergy crop *Ricinus communis* for DDTs and cadmium co-contaminated soil. *Bioresource Technology* [online]. **102**(23), 11034–11038. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2011.09.067

HUSSAIN, Sarfraz, Tariq SIDDIQUE, Muhammad ARSHAD a Muhammad SALEEM, 2009. Bioremediation and Phytoremediation of Pesticides: Recent Advances. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. **39**(10), 843–907. ISSN 1064-3389. Dostupné z: doi:10.1080/10643380801910090

CHAPMAN, Peter M., 2007. Determining when contamination is pollution - weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International* [online]. **33**(4), 492–501. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2006.09.001

CHAUDHRY, Qasim, Peter SCHRÖDER, Daniele WERCK-REICHHART, Włodzimierz GRAJEK a Roman MARECIK, 2002. Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **9**(1), 4–17. ISSN 0944-1344, 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/BF02987313

CHEN, Qing, Honghu ZENG, Yanpeng LIANG, Litang QIN, Guangsheng PENG, Liangliang HUANG a Xiaohong SONG, 2021. Purification Effects on β -HCH Removal and Bacterial Community Differences of Vertical-Flow Constructed Wetlands with Different Vegetation Plantations. *Sustainability* [online]. **13**(23), 13244. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su132313244



CHIORCEA-PAQUIM, Ana-Maria, Teodor Adrian ENACHE, Eric DE SOUZA GIL a Ana Maria OLIVEIRA-BRETT, 2020. Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **19**(4), 1680–1726. ISSN 1541-4337, 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12566

CHO, Soon-Kil, A. M. ABD EL-ATY, Ki Hun PARK, Jong-Hyouk PARK, M. E. ASSAYED, Yang-Mo JEONG, Young-Seok PARK a Jae-Han SHIM, 2013. Simple multiresidue extraction method for the determination of fungicides and plant growth regulator in bean sprouts using low temperature partitioning and tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. **136**(3), ASSET 2011, 1414–1420. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.068

IARC, 1987. *Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1–42*. ISBN 978-92-832-1411-3.

IARC, 2015a. *DDT, Lindane, and 2,4-D* [online] [vid. 2023-11-09]. ISBN 978-92-832-0179-3. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/DDT-Lindane-And-2-4-D-2016>

IARC, 2015b. International Agency for Research of Cancer Monographs evaluate DDT, lindane, and 2,4-D. 2.

KANG, Fuxing, Dongsheng CHEN, Yanzheng GAO a Yi ZHANG, 2010. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC plant biology* [online]. **10**, 210. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2229-10-210

KATAM, Ramesh, Chuwei LIN, Kirstie GRANT, Chaquayla S. KATAM a Sixue CHEN, 2022. Advances in Plant Metabolomics and Its Applications in Stress and Single-Cell Biology. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(13), 6985. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23136985

KHAN, Faizan Haider, Panneer GANESAN a Sudhir KUMAR, 2010. Y Chromosome microdeletion and altered sperm quality in human males with high concentration of seminal hexachlorocyclohexane (HCH). *Chemosphere* [online]. **80**(9), 972–977. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2010.05.047

KIISKILA, Jeffrey D., Padmini DAS, Dibyendu SARKAR a Rupali DATTA, 2015. Phytoremediation of Explosive-Contaminated Soils. *Current Pollution Reports* [online]. **1**(1), 23–34. ISSN 2198-6592. Dostupné z: doi:10.1007/s40726-015-0003-3

KOGA, Jinichiro, 1995. Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [online]. **1249**(1), 1–13. ISSN 0167-4838. Dostupné z: doi:10.1016/0167-4838(95)00011-1

KOCHHAR, S. L. a Sukhbir Kaur GUJRAL, ed., 2020. Plant Hormones and Signal Transduction. In: S. L. KOCHHAR a Sukhbir Kaur GUJRAL, ed. *Plant Physiology: Theory and Applications* [online]. 2. vyd. Cambridge: Cambridge University Press, s. 468–525 [vid. 2022-01-14]. ISBN 978-1-108-48639-2. Dostupné z: doi:10.1017/9781108486392.019



KOJIMA, Mikiko, Tomoe KAMADA-NOBUSADA, Hirokazu KOMATSU, Kentaro TAKEI, Takeshi KUROHA, Masaharu MIZUTANI, Motoyuki ASHIKARI, Miyako UEGUCHI-TANAKA, Makoto MATSUOKA, Koji SUZUKI a Hitoshi SAKAKIBARA, 2009. Highly Sensitive and High-Throughput Analysis of Plant Hormones Using MS-Probe Modification and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Application for Hormone Profiling in *Oryza sativa*. *Plant and Cell Physiology* [online]. **50**(7), 1201–1214. ISSN 0032-0781. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcp057

KOMBRINK, Erich, 2012. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* [online]. **236**(5), 1351–1366. ISSN 1432-2048. Dostupné z: doi:10.1007/s00425-012-1705-z

KOŠKOVÁ, Stanislava, Petra ŠTOCHLOVÁ, Kateřina NOVOTNÁ, Aday AMIRBEKOV a Pavel HRABÁK, 2022. Influence of delta-hexachlorocyclohexane (δ-HCH) to *Phytophthora* xalni resistant *Alnus glutinosa* genotypes – Evaluation of physiological parameters and remediation potential. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. **247**, 114235. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2022.114235

KOTKAR, Gayatri D., Abhijit D. SHETGAONKAR a Santosh G. TILVE, 2023. Chapter 6 - Diversity of chemical skeletons: a practical strategy to benefit. In: Surya Nandan MEENA, Vinod NANDRE, Kisan KODAM a Ram Swaroop MEENA, ed. *New Horizons in Natural Compound Research* [online]. B.m.: Academic Press, Progress in Biochemistry and Biotechnology, s. 75–132 [vid. 2024-08-28]. ISBN 978-0-443-15232-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-443-15232-0.00023-0

KOTOV, Andrey A., Liudmila M. KOTOVA a Georgy A. ROMANOV, 2021. Signaling network regulating plant branching: Recent advances and new challenges. *Plant Science* [online]. **307**, 110880. ISSN 0168-9452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2021.110880

KROYMANN, Juergen, 2011. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. **14**(3), 246–251. ISSN 1369-5266. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbi.2011.03.021

LAQUITAINE, L., A. DURIMEL, L. F. DE ALENCASTRO, C. JEAN-MARIUS, O. GROS a S. GASPARD, 2016. Biodegradability of HCH in agricultural soils from Guadeloupe (French West Indies): identification of the lin genes involved in the HCH degradation pathway. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **23**(1), 120–127. ISSN 0944-1344, 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-015-5875-7

LE BRIS, Manuel, 2017. Hormones in Growth and Development☆. In: *Reference Module in Life Sciences* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2022-01-16]. ISBN 978-0-12-809633-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.05058-5

LEFEVERE, Hannes, Lander BAUTERS a Godelieve GHEYSEN, 2020. Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science* [online]. **11** [vid. 2022-01-20]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00338>

LIANG, Ming-Qiu, Cheng-Feng ZHANG, Chang-Lian PENG, Zeng-Long LAI, Da-Feng CHEN a Zhang-He CHEN, 2011. Plant growth, community structure, and nutrient removal in



monoculture and mixed constructed wetlands. *Ecological Engineering* [online]. **37**(2), 309–316. ISSN 0925-8574. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoleng.2010.11.018

LIMMER, Matt, Jean BALOUET, Frank KARG, Don VROBLESKY a Joel BURKEN, 2011. Phytoscreening for Chlorinated Solvents Using Rapid in Vitro SPME Sampling: Application to Urban Plume in Verl, Germany. *Environmental science & technology* [online]. **45**, 8276–82. Dostupné z: doi:10.1021/es201704v

LIU, Hong-Tao, Yan-Fen LI, Tian-Gang LUAN, Chong-Yu LAN a Wen-Sheng SHU, 2007. Simultaneous Determination of Phytohormones in Plant Extracts using SPME and HPLC. *Chromatographia* [online]. **66**(7), 515–520. ISSN 1612-1112. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-007-0350-3

LIU, Wan, Peijun LI, Qixing ZHOU, Tieheng SUN, Peidong TAI a Huaxia XU, 2005. Short-term toxic effects of chlorobenzenes on broadbean (*Vicia faba*) seedlings. *Science in China Series C: Life Sciences* [online]. **48**(1), 33–39. ISSN 1862-2798. Dostupné z: doi:10.1007/BF02889799

LIU, Xiao, Langping WU, Steffen KÜMMEL a Hans H. RICHNOW, 2021. Characterizing the biotransformation of hexachlorocyclohexanes in wheat using compound-specific stable isotope analysis and enantiomer fraction analysis. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **406**, 124301. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124301

MACHADO, A. I., R. FRAGOSO, A. V. DORDIO a E. DUARTE, 2020. Performance of *Iris pseudacorus* and *Typha domingensis* for furosemide removal in a hydroponic system. *International Journal of Phytoremediation* [online]. **22**(8), 863–871. ISSN 1522-6514. Dostupné z: doi:10.1080/15226514.2020.1717431

MAMIROVA, Aigerim, Valentina PIDLISNYUK, Aday AMIRBEKOV, Alena ŠEVCŮ a Asil NURZHANOVA, 2021. Phytoremediation potential of *Miscanthus sinensis* And. in organochlorine pesticides contaminated soil amended by Tween 20 and Activated carbon. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **28**(13), 16092–16106. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-020-11609-y

MARURI-LÓPEZ, Israel, Norma Yaniri AVILES-BALTAZAR, Antony BUCHALA a Mario SERRANO, 2019. Intra and Extracellular Journey of the Phytohormone Salicylic Acid. *Frontiers in Plant Science* [online]. **10** [vid. 2022-01-20]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00423>

MATEJU, Vit, 2006. *Kompéndium sanačnických technologií*. 1. vyd. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor. ISBN 80-86832-15-5.

MERCADO-BORRAYO, B. M., Silke CRAM HEYDRICH, Irma ROSAS PÉREZ, Manuel HERNÁNDEZ QUIROZ a Claudia PONCE DE LEÓN HILL, 2015. Organophosphorus and Organochlorine Pesticides Bioaccumulation by *Eichhornia crassipes* in Irrigation Canals in an Urban Agricultural System. *International Journal of Phytoremediation* [online]. **17**(7), 701–708. ISSN 1522-6514. Dostupné z: doi:10.1080/15226514.2014.964841

MIERSCH, Otto, Robert KRAMELL, Benno PARTHIER a Claus WASTERNAK, 1999. Structure–activity relations of substituted, deleted or stereospecifically altered jasmonic acid



in gene expression of barley leaves. *Phytochemistry* [online]. **50**(3), 353–361. ISSN 0031-9422. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(98)00597-4

MIGUEL, Angélique San, Mathieu FAURE, Patrick RAVANEL a Muriel RAVETON, 2012. Biological responses of maize (*Zea mays*) plants exposed to chlorobenzenes. Case study of monochloro-, 1,4-dichloro- and 1,2,4-trichloro-benzenes. *Ecotoxicology* [online]. **21**(2), 315–324. ISSN 1573-3017. Dostupné z: doi:10.1007/s10646-011-0792-0

MOHLENBROCK, Robert H, 1989. *Plant Fact Sheet - Juncus effusus L.* [online]. 1989. B.m.: United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Dostupné z: https://plants.usda.gov/DocumentLibrary/factsheet/pdf/fs_juef.pdf

MOHSIN, Muhammad, Nicole NAWROT, Ewa WOJCIECHOWSKA, Suvi KUITTINEN, Katarzyna SZCZEPAŃSKA, Grażyna DEMBSKA a Ari PAPPINEN, 2023. Cadmium accumulation by *Phragmites australis* and *Iris pseudacorus* from stormwater in floating treatment wetlands microcosms: Insights into plant tolerance and utility for phytoremediation. *Journal of Environmental Management* [online]. **331**, 117339. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2023.117339

MOORE, M. T. a M. A. LOCKE, 2012. Phytotoxicity of Atrazine, S-Metolachlor, and Permethrin to *Typha latifolia* (Linneaus) Germination and Seedling Growth. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. **89**(2), 292–295. ISSN 1432-0800. Dostupné z: doi:10.1007/s00128-012-0682-z

NAMIKI, Sayuri, 2022. Studies on the abilities of uptake and translocation from root to shoot of pesticides in soil. *Journal of Pesticide Science* [online]. **47**(3), 131. Dostupné z: doi:10.1584/jpestics.J22-01

NEILSON, Elizabeth H., Jason Q. D. GOODGER, Ian E. WOODROW a Birger Lindberg MØLLER, 2013. Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science* [online]. **18**(5), 250–258. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2013.01.001

NGABE, Barnabe, Terry F. BIDDLEMAN a Renee L. FALCONER, 2002. Base hydrolysis of α - and γ -hexachlorocyclohexanes. *ACS Publications* [online]. B.m.: American Chemical Society [vid. 2023-10-18]. Dostupné z: doi:10.1021/es00046a024

NOGUÉ, Fabien, Martine GONNEAU a Jean-Denis FAURE, 2003. Cytokinins. In: Helen L. HENRY a Anthony W. NORMAN, ed. *Encyclopedia of Hormones* [online]. New York: Academic Press, s. 371–378 [vid. 2022-01-16]. ISBN 978-0-12-341103-7. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-341103-3/00061-9

OSUGI, Asami a Hitoshi SAKAKIBARA, 2015. Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biology* [online]. **13**(1), 102. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/s12915-015-0214-5

OTTOSEN, Cecilie, Vinni RØNDE, Stefan TRAPP, Poul BJERG a Mette BROHOLM, 2018. Phytoscreening for Vinyl Chloride in Groundwater Discharging to a Stream. *Groundwater Monitoring & Remediation* [online]. **38**. Dostupné z: doi:10.1111/gwmr.12253



- PAN, Jinjing, Houping WANG, Qiugui YOU, Rui CAO, Guiling SUN a Diqui YU, 2023. Jasmonate-regulated seed germination and crosstalk with other phytohormones. *Journal of Experimental Botany* [online]. **74**(4), 1162–1175. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erac440
- PANDEY, Kanti Bhooshan a Syed Ibrahim RIZVI, 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2**(5), 270–278. ISSN 1942-0900.
- PANZ, Katarzyna a Korneliusz MIKSCH, 2012. Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wild-type and transgenic plants. *Journal of Environmental Management* [online]. **113**, 85–92. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2012.08.016
- PAVLOVÁ, Libuše, 2006. *Fyziologie rostlin* [online]. 2006. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0985-1. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyzrost/>
- PENG, Weihua, Xiaomin LI, Shengtao XIAO a Wenhong FAN, 2018. Review of remediation technologies for sediments contaminated by heavy metals. *Journal of Soils and Sediments* [online]. **18**(4), 1701–1719. ISSN 1614-7480. Dostupné z: doi:10.1007/s11368-018-1921-7
- PERIN, Ellen Cristina, Rosane Lopes CRIZEL, Vanessa GALLI, Rafael da Silva MESSIAS, Cesar Valmor ROMBALDI a Fabio Clasen CHAVES, 2018. Extraction and Quantification of Absciscic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. *Food Analytical Methods* [online]. **11**(9), 2547–2552. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-018-1224-z
- PETROUTSOS, Dimitris, Jiangxin WANG, Petros KATAPODIS, Dimitris KEKOS, Milton SOMMERFELD a Qiang HU, 2007. Toxicity and metabolism of p-chlorophenol in the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Aquatic Toxicology* [online]. **85**(3), 192–201. ISSN 0166-445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2007.09.007
- PILON-SMITS, Elizabeth, 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* [online]. **56**, 15–39. ISSN 1543-5008. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214
- PODLEŠÁKOVÁ, Kateřina, Joel FARDOUX, Delphine PATREL, Katia BONALDI, Ondřej NOVÁK, Miroslav STRNAD, Eric GIRAUD, Lukáš SPÍCHAL a Nico NOUWEN, 2013. Rhizobial synthesized cytokinins contribute to but are not essential for the symbiotic interaction between photosynthetic Bradyrhizobia and Aeschynomene legumes. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* [online]. **26**(10), 1232–1238. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-03-13-0076-R
- PRATHNA, T. C., 2021. Chapter 9 - Significance of microbial volatiles in ecological health: impact on wetland systems. In: Ajay KUMAR, Joginder SINGH a Justin SAMUEL, ed. *Volatiles and Metabolites of Microbes* [online]. B.m.: Academic Press, s. 163–176 [vid. 2024-01-24]. ISBN 978-0-12-824523-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824523-1.00020-1
- PROCHÁZKA, S., I. MACHÁČKOVÁ, J. KREKULE a J. ŠEBÁNEK, 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-0586-1.
- PUENTES JÁCOME, Luz A., Line LOMHEIM, Sarra GASPARD a Elizabeth A. EDWARDS, 2021. Biodegradation of Lindane (γ -Hexachlorocyclohexane) To Nontoxic End Products by



Sequential Treatment with Three Mixed Anaerobic Microbial Cultures. *Environmental Science & Technology* [online]. **55**(5), 2968–2979. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.0c07221

RABIZADEH, Fatemeh, Maryam Sadat MIRIAN, Rahele DOOSTI, Roya KIANI-ANBOUHI a Elahe EFTEKHARI, 2022. Phytochemical Classification of Medicinal Plants Used in the Treatment of Kidney Disease Based on Traditional Persian Medicine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* [online]. **2022**, 8022599. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2022/8022599

RIBNICKY, David M., Jerry D. COHEN, Wei-Shou HU a Todd J. COOKE, 2002. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta* [online]. **214**(4), 505–509. ISSN 1432-2048. Dostupné z: doi:10.1007/s004250100639

RODRÍGUEZ-GARRIDO, Beatriz, María BALSEIRO-ROMERO, Petra S. KIDD a Carmen MONTERROSO, 2020. Effect of plant root exudates on the desorption of hexachlorocyclohexane isomers from contaminated soils. *Chemosphere* [online]. **241**, 124920. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124920

ROLČÍK, Jakub, Jana ŘEČINSKÁ, Petr BARTÁK, Miroslav STRNAD a Els PRINSEN, 2005. Purification of 3-indolylacetic acid by solid phase extraction. *Journal of Separation Science* [online]. **28**(12), 1370–1374. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200500189

ROY, Aditi, Poornima VAJPAYEE, Suchi SRIVASTAVA a Pankaj Kumar SRIVASTAVA, 2023. Revelation of bioremediation approaches for hexachlorocyclohexane degradation in soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **39**(9), 243. ISSN 1573-0972. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-023-03692-3

RUAN, Jingjun, Yuexia ZHOU, Meiliang ZHOU, Jun YAN, Muhammad KHURSHID, Wenfeng WENG, Jianping CHENG a Kaixuan ZHANG, 2019. Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(10), 2479. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20102479

SAH, Saroj K., Kambham R. REDDY a Jiaxu LI, 2016. Absciscic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science* [online]. **7**, 571. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2016.00571

SAINI, Nancy, Anmol ANMOL, Sanjeev KUMAR, Ab Waheed WANI, Manish BAKSHI a Zarina DHIMAN, 2024. Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants-a comprehensive review. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [online]. **133**, 102383. ISSN 0885-5765. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmpp.2024.102383

SAKAKIBARA, Masayuki, Yuko OHMORI, Nguyen Thi Hoang HA, Sakae SANO a Koichiro SERA, 2011. Phytoremediation of heavy metal-contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. *CLEAN – Soil, Air, Water* [online]. **39**(8), 735–741. ISSN 1863-0669. Dostupné z: doi:10.1002/clen.201000488

SANDERMANN, Heinrich, 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **17**(2), 82–84. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/0968-0004(92)90507-6



SCALABRIN, Elisa, Marta RADAELLI a Gabriele CAPODAGLIO, 2016. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. **103**, 53–60. ISSN 0981-9428. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2016.02.040

SEGARRA, Guillem, Olga JÁUREGUI, Eva CASANOVA a Isabel TRILLAS, 2006. Simultaneous quantitative LC–ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry* [online]. **67**(4), 395–401. ISSN 0031-9422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2005.11.017

SCHMELZ, E.A., J. ENGELBERTH, H.T. ALBORN, P. O'DONNELL, M. SAMMONS, H. TOSHIMA a J.H. TUMLINSON III, 2003. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **100**(18), 10552–10557. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1633615100

SCHMÜLLING, T., 2013. Cytokinin. In: William J. LENNARZ a M. Daniel LANE, ed. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* [online]. Waltham: Academic Press, s. 627–631 [vid. 2022-01-16]. ISBN 978-0-12-378631-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00456-4

SCHWITZGUÉBEL, Jean-Paul, Joana MEYER a Petra KIDD, 2006. Pesticides Removal Using Plants: Phytodegradation Versus Phytostimulation [online]. ISSN 978-1-4020-4952-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-4999-4_13

SIMPSON, Nigel J. K., 2000. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. New York, NY: CRC Press. ISBN 0-8247-0021-X.

SINGH, Kshitij, Sonam TRIPATHI a Ram CHANDRA, 2023. Bacterial assisted phytoremediation of heavy metals and organic pollutants by *Cannabis sativa* as accumulator plants growing on distillery sludge for ecorestoration of polluted site. *Journal of Environmental Management* [online]. **332**, 117294. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2023.117294

SINGH, Pramod Kumar a Shruti GAUTAM, 2013. Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. **35**(8), 2345–2353. ISSN 0137-5881, 1861-1664. Dostupné z: doi:10.1007/s11738-013-1279-9

SINGH, Richa a Kirpa RAM, 2022. Environmental Remediation Technologies. In: Vijay P. SINGH, Shalini YADAV, Krishna Kumar YADAV a Ram Narayan YADAVA, ed. *Environmental Degradation: Challenges and Strategies for Mitigation* [online]. Cham: Springer International Publishing, Water Science and Technology Library, s. 211–225 [vid. 2023-10-18]. ISBN 978-3-030-95542-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-95542-7_10

SINHA, Sarita, 2002. Oxidative stress induced by HCH in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: modulation in uptake and toxicity due to Fe. *Chemosphere* [online]. **46**(2), 281–288. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(01)00091-1



SOMTRAKOON, Khanitta, Maleeya KRUATRACHUE a Hung LEE, 2014. Phytoremediation of Endosulfan Sulfate-Contaminated Soil by Single and Mixed Plant Cultivations. *Water, Air, & Soil Pollution* [online]. **225**(3), 1886. ISSN 1573-2932. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-014-1886-0

SOREK, A., N. ATZMON, O. DAHAN, Z. GERSTL, L. KUSHISIN, Y. LAOR, U. MINGELGRIN, A. NASSER, D. RONEN, L. TSECHANSKY, N. WEISBROD a E. R. GRABER, 2008. "Phytoscreening": The Use of Trees for Discovering Subsurface Contamination by VOCs. *Environmental Science & Technology* [online]. **42**(2), 536–542. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es072014b

SOUZA, Leonardo Perez de, Saleh ALSEEKH, Thomas NAAKE a Alisdair FERNIE, 2019. Mass Spectrometry-Based Untargeted Plant Metabolomics. *Current Protocols in Plant Biology* [online]. **4**(4), e20100. ISSN 2379-8068. Dostupné z: doi:10.1002/cppb.20100

SPARTZ, Angela K. a William M. GRAY, 2008. Plant hormone receptors: new perceptions. *Genes & Development* [online]. **22**(16), 2139–2148. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1693208

SRIVASTAVA, Lalit M., 2002. *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-08-051403-1.

STOCKHOLM CONVENTION, 2019. *The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants* [online] [vid. 2021-05-28]. Dostupné z: <http://www.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>

SUCHÁNEK, Miloslav a David MILDE, 2013. *KVALIMETRIE 18. Názvosloví analytického měření: Úvod do 3. vydání Mezinárodního metrologického slovníku. Jak vyhovět požadavkům ISO 17025 na verifikaci metod*. [online]. Praha: EURACHEM-ČR. ISBN 80-86322-06-8. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/wp-content/uploads/2022/07/Kvalimetrie18-fin.pdf>

ŠETLÍK, I., J. ŠANTRŮČEK a F. SEIDLOVÁ, 2004. *Fyziologie rostlin* [online] [vid. 2022-01-14]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html>

ŠIMURA, Jan, Ioanna ANTONIADI, Jitka ŠIROKÁ, Danuše TARKOWSKÁ, Miroslav STRNAD, Karin LJUNG a Ondřej NOVÁK, 2018. Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiology* [online]. **177**(2), 476–489. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.18.00293

TAKAHASHI, Hideki, Yoshinori KANAYAMA, Ming Shu ZHENG, Tomonobu KUSANO, Shu HASE, Masato IKEGAMI a Jyoti SHAH, 2004. Antagonistic Interactions between the SA and JA Signaling Pathways in Arabidopsis Modulate Expression of Defense Genes and Gene-for-Gene Resistance to Cucumber Mosaic Virus. *Plant and Cell Physiology* [online]. **45**(6), 803–809. ISSN 0032-0781. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pch085

TAMOGAMI, S., G. K. AGRAWAL a R. RAKWAL, 2011. Chapter 6 - Jasmonates to Jasmonolites in Plants: Past, Present, and Future. In: Jean-Claude KADER a Michel DELSENY,



ed. *Advances in Botanical Research* [online]. B.m.: Academic Press, s. 309–348 [vid. 2022-01-18]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385851-1.00006-8

TEOH, Eng Soon, 2015. Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia* [online]. 59–73. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-24274-3_5

TIAN, Qiuying, Fanjun CHEN, Jinxin LIU, Fusuo ZHANG a Guohua MI, 2008. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *Journal of Plant Physiology* [online]. **165**(9), 942–951. ISSN 0176-1617. Dostupné z: doi:10.1016/j.jplph.2007.02.011

TUTEJA, Narendra, 2007. Absciscic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Behavior* [online]. **2**(3), 135–138. Dostupné z: doi:10.4161/psb.2.3.4156

VANĚK, Tomáš, Petr SOUDEK, Radka PODLIPNÁ, Šárka PETROVÁ a Přemysl LANDA, 2017. *Fytoremediace a možnosti její aplikace*. Praha: Středisko společných činností AV ČR. ISBN 978-80-270-2248-9.

VANGRONSVELD, Jaco, Rolf HERZIG, Nele WEYENS, Jana BOULET, Kristin ADRIAENSEN, Ann RUTTENS, Theo THEWYS, Andon VASSILEV, Erik MEERS, Erika NEHNEVAJOVA, Daniel VAN DER LELIE a Michel MENCH, 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **16**(7), 765–794. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-009-0213-6

VIJGEN, John, P. C. ABHILASH, Yi Fan LI, Rup LAL, Martin FORTER, Joao TORRES, Nandita SINGH, Mohammad YUNUS, Chongguo TIAN, Andreas SCHÄFFER a Roland WEBER, 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **18**(2), 152–162. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-010-0417-9

VIJGEN, John, Boudewijn FOKKE, Guido VAN DE COTERLET, Katja AMSTAETTER, Javier SANCHO, Carlo BENSÁIAH a Roland WEBER, 2022. European cooperation to tackle the legacies of hexachlorocyclohexane (HCH) and lindane. *Emerging Contaminants* [online]. **8**, 97–112. ISSN 2405-6650. Dostupné z: doi:10.1016/j.emcon.2022.01.003

VIJGEN, John, Yi-Fan LI, Martin FORTER, Rup LAL a Roland WEBER, 2005. The legacy of lindane and technical HCH production. *Organohalogen Compounds*. **68**, 899–904.

VILLETTE, C., L. MAURER, J. DELECOLLE, J. ZUMSTEG, M. ERHARDT a D. HEINTZ, 2019. In situ localization of micropollutants and associated stress response in *Populus nigra* leaves. *Environment International* [online]. **126**, 523–532. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.02.066

WACŁAWEK, Stanisław, Vojtech ANTOŠ, Pavel HRABÁK, Miroslav ČERNÍK a Daniel ELLIOTT, 2016. Remediation of hexachlorocyclohexanes by electrochemically activated persulfates. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **23**(1), 765–773. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-015-5312-y



WACŁAWEK, Stanisław, Daniele SILVESTRI, Pavel HRABÁK, Vinod V. T. PADIL, Rafael TORRES-MENDIETA, Maria WACŁAWEK, Miroslav ČERNÍK a Dionysios D. DIONYSIOU, 2019. Chemical oxidation and reduction of hexachlorocyclohexanes: A review. *Water Research* [online]. **162**, 302–319. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2019.06.072

WALKER, Kathleen, Daniel A. VALLERO a Robert G. LEWIS, 1999. Factors Influencing the Distribution of Lindane and Other Hexachlorocyclohexanes in the Environment. *Environmental Science & Technology* [online]. **33**(24), 4373–4378. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es990647n

WANG, Fang, Jing GAO, Wangjing ZHAI, Jingna CUI, Yifan HUA, Zhiqiang ZHOU, Donghui LIU, Peng WANG a Hongjun ZHANG, 2021a. Accumulation, distribution and removal of triazine pesticides by *Eichhornia crassipes* in water-sediment microcosm. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. **219**, 112236. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112236

WANG, Feiyan, Xin LI, Sumei YU, Shuhong HE, Duantao CAO, Shijie YAO, Hua FANG a Yunlong YU, 2021b. Chemical factors affecting uptake and translocation of six pesticides in soil by maize (*Zea mays* L.). *Journal of Hazardous Materials* [online]. **405**, 124269. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124269

WANG, Jia, Li SONG, Xue GONG, Jinfan XU a Minhui LI, 2020a. Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(4), 1446. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21041446

WANG, Yifeng, Yuxuan HOU, Jiehua QIU, Huimei WANG, Shuang WANG, Liquan TANG, Xiaohong TONG a Jian ZHANG, 2020b. Abscissic acid promotes jasmonic acid biosynthesis via a „SAPK10-bZIP72-AOC” pathway to synergistically inhibit seed germination in rice (*Oryza sativa*). *The New Phytologist* [online]. **228**(4), 1336–1353. ISSN 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.16774

WASTERNAK, C. a B. HAUSE, 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* [online]. **111**(6), 1021–1058. ISSN 0305-7364. Dostupné z: doi:10.1093/aob/mct067

WEBER, Roland, Gulchohra ALIYEVA a John VIJGEN, 2013. The need for an integrated approach to the global challenge of POPs management. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **20**(4), 1901–1906. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-012-1247-8

WEBER, Roland a Bertram KUCH, 2003. Relevance of BFRs and thermal conditions on the formation pathways of brominated and brominated–chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans. *Environment International* [online]. **29**(6), The State-of-Science and Trends of BFRs in the Environment, 699–710. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/S0160-4120(03)00118-1

WILLETT, Kristine L., Elin M. ULRICH a Ronald A. HITES, 1998. Differential Toxicity and Environmental Fates of Hexachlorocyclohexane Isomers. *Environmental Science &*



Technology [online]. **32**(15), 2197–2207. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es9708530

WINK, Michael, 2011. *Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. B.m.: John Wiley & Sons. ISBN 978-1-4443-4791-3.

WOODWARD, ANDREW W. a BONNIE BARTEL, 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* [online]. **95**(5), 707–735. ISSN 0305-7364. Dostupné z: doi:10.1093/aob/mci083

WU, Langping, Yaqing LIU, Xiao LIU, Abhay BAJAJ, Monika SHARMA, Rup LAL a Hans H. RICHNOW, 2019. Isotope fractionation approach to characterize the reactive transport processes governing the fate of hexachlorocyclohexanes at a contaminated site in India. *Environment International* [online]. **132**, 105036. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.105036

XIN, Peiyong, Qihuan GUO, Bingbing LI, Shujing CHENG, Jijun YAN a Jinfang CHU, 2020. A Tailored High-Efficiency Sample Pretreatment Method for Simultaneous Quantification of 10 Classes of Known Endogenous Phytohormones. *Plant Communications* [online]. **1**(3), Focus Issue on Plant Hormones (Organizing Editors: Steven Smith, Jan Hejátko, Yonghong Wang, Daoxin Xie), 100047. ISSN 2590-3462. Dostupné z: doi:10.1016/j.xplc.2020.100047

YALCIN, Sibel, Emine Sukran OKUDAN, Ozge KARAKAS, Ayse Nur ONEM a Kevser Sozgen BASKAN, 2019. Identification and quantification of some phytohormones in seaweeds using UPLC-MS/MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. **42**(15–16), 475–484. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2019.1625374

YAMAGUCHI, Isomaro, Jerry D. COHEN, Angela H. CULLER, Marcel QUINT, Janet P. SLOVIN, Masatoshi NAKAJIMA, Shinjiro YAMAGUCHI, Hitoshi SAKAKIBARA, Takeshi KUROHA, Nobuhiro HIRAI, Takao YOKOTA, Hiroyuki OHTA, Yuichi KOBAYASHI, Hitoshi MORI a Yoji SAKAGAMI, 2010. 4.02 - Plant Hormones. In: Hung-Wen (Ben) LIU a Lew MANDER, ed. *Comprehensive Natural Products II* [online]. Oxford: Elsevier, s. 9–125 [vid. 2019-10-02]. ISBN 978-0-08-045382-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-045382-8.00092-7

YUAN, Kun, Aaron M. RASHOTTE a Joanna W. WYSOCKA-DILLER, 2011. ABA and GA signaling pathways interact and regulate seed germination and seedling development under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. **33**(2), 261–271. ISSN 1861-1664. Dostupné z: doi:10.1007/s11738-010-0542-6

ZHANG, Jun a Wendy Ann PEER, 2017. Auxin homeostasis: the DAO of catabolism. *Journal of Experimental Botany* [online]. **68**(12), 3145–3154. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erx221

ZHANG, Xingfeng, Hanping XIA, Zhi'an LI, Ping ZHUANG a Bo GAO, 2011. Identification of a new potential Cd-hyperaccumulator *Solanum photeinocarpum* by soil seed bank-metal concentration gradient method. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **189**(1), 414–419. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2011.02.053



ZÜRCHER, Evelyne, Jingchun LIU, Martin DI DONATO, Markus GEISLER a Bruno MÜLLER, 2016. Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **353**(6303), 1027–1030. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaf7254