

# Využití exogenně aplikovaných látek na bázi druhotných surovin pro fytořemediaci toxických kovů

Mgr. Nataliia Licinar

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Mgr. Nataliia Licinar**  
Osobní číslo: **T22344**  
Studijní program: **N0712A030001 Environmentální inženýrství**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Využití exogenně aplikovaných látek na bázi druhotných surovin pro fytořadu toxických kovů**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Proveďte testy klíčivosti a analýzu obsahu vybraných kovů v jednotlivých částech rostlin.
3. Naměřená a vypočtená data zpracujte a dosažené výsledky kriticky zhodnotte.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.

STINGU, Alina, et al. New approaches concerning the utilization of natural amendments in cadmium phytoremediation. *Industrial Crops and Products*, 2012, 35.1:53-60.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Markéta Julinová, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

**Příloha č. 4 – Prohlášení autorky DP**

**PROHLÁŠENÍ AUTORKY  
DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

**Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....  
podpis studentky

## ABSTRAKT

V rámci diplomové práce byl studován vliv keratinového hydrolyzátu získaného z kuřecího peří enzymatickou hydrolyzou na rostliny vystavené účinkům těžkých kovů. Teoretická část pojednává o přípravě bílkovinných hydrolyzátů, jejich využití a možných účincích na rostliny. Poslední kapitola teoretické části se věnuje fytořediačním technikám a možnostem posílení schopnosti rostlin akumulovat těžké kovy přidáním chelatačních činidel. Praktická část této diplomové práce byla zaměřena na sledování vlivu aplikace keratinového hydrolyzátu a těžkých kovů na vybrané druhy rostlin. Pro hodnocení byl použit test klíčivosti na Petriho miskách, přičemž jako hodnotící kritéria byla vypočtena a sledována klíčivost, délka kořenů i nadzemní části, hmotnost sušiny, inhibice růstu a obsah chlorofylu. Kadmium při koncentracích 5-20 mg/l nevykazovalo zásadní negativní vliv na množství biomasy rostlin a neprojevoval významnou fytotoxicitu. Byl pozorován jen mírný inhibiční efekt na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Naopak růst rostlin byl významně snížen vlivem arsenu, který projevil vysokou toxicitu a silnou inhibici růstu. Ukázalo se, že přidání keratinového hydrolyzátu má pozitivní účinek na rostliny, při aplikované koncentraci 400 mg/l zvyšuje toleranci rostlin vůči As a Cd. Pro stanovení obsahu kadmia a arsenu v rostlinách byla provedena analýza pomocí atomové adsorpční spektrofotometrie (AAS). Na základě výsledku analýzy bylo zjištěno a potvrzeno, že přítomnost keratinového hydrolyzátu zvyšuje akumulaci As a Cd v rostlinách. FTIR analýza ukázala specifické interakce, tj. na chelátovou formu Cd, resp. As v kořenech ječmene setého (*Hordeum vulgare*).

Klíčová slova: fytořediace, těžké kovy, kadmium, arsen, keratinový hydrolyzát, ječmen setý (*Hordeum vulgare*), znečištění životního prostředí

## ABSTRACT

This master thesis studies the effect of keratin hydrolysate obtained from chicken feathers by enzymatic hydrolysis on plants exposed to heavy metals. The theoretical part introduces the preparation of protein hydrolysates, their use and possible effects on plants. Its last chapter is devoted to phytoremediation techniques and the possibility of enhancing the ability of plants to accumulate heavy metals by adding chelating agents. The practical part of this thesis focuses on monitoring the effect of keratin hydrolysate and heavy metal application on selected plant species. The germination test on Petri dishes was used to evaluate germination, root and aerial length, dry weight, growth inhibition and chlorophyll content. Cadmium at concentrations between 5-20 mg/l did not show any significant negative effect on the amount of plant biomass or phytotoxicity. Only a slight inhibitory effect on the growth of barley (*Hordeum vulgare*) was observed. In contrast, plant growth was considerably reduced by arsenic performing high toxicity and strong growth inhibition. The addition of keratin hydrolysate was proved to have a positive effect on plants by increasing their tolerance to As and Cd when applied at a concentration of 400 mg/l. Atomic adsorption spectrophotometry (AAS) analysis was carried out to determine cadmium and arsenic content of the plants. Based on the obtained results, it has been confirmed that the presence of keratin hydrolysate encourages the accumulation of As and Cd in plants. FTIR analysis showed specific interactions, specifically the chelated form of Cd and As in the roots of barley (*Hordeum vulgare*).

Keywords: phytoremediation, heavy metals, cadmium, arsenic, keratin hydrolysate, barley (*Hordeum vulgare*), environmental pollution

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé práce, paní doc. Ing. Markétě Julinové, Ph.D. za obrovskou trpělivost, velikou pomoc, připomínky a cenné rady při zpracování závěrečné práce.

Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Štěpánu Vinterovi, Ph.D. za veškerý čas, který mi věnoval při odborném vedení některých pokusů experimentální části.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému manželovi za psychickou oporu a podporu při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 TYPY BÍLKOVINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ A JEJICH CHARAKTERISTIKA .....</b>	<b>12</b>
1.1 HYDROLYZÁTY NA BÁZI KERATINU .....	14
1.2 HYDROLYZÁTY NA BÁZI KOLAGENU .....	16
<b>2 VLIV BÍLKOVINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ NA ROSTLINY .....</b>	<b>21</b>
2.1 HNOJIVA BOHATÁ NA DUSÍK.....	21
<b>3 FYTOREMEDIACE .....</b>	<b>29</b>
3.1 FYTOREMEDIÁČNÍ TECHNOLOGIE .....	30
3.2 CHELATAČNÍ ČINIDLA .....	31
3.3 ALTERNATIVNÍ CHELATAČNÍ ČINIDLA .....	35
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>37</b>
<b>4 MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>38</b>
4.1 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY .....	38
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	38
4.3 TESTOVANÁ LÁTKA .....	39
4.4 ROSTLINNÝ MATERIÁL .....	41
4.4.1 Test klíčivosti .....	41
4.4.2 Vliv keratinového hydrolyzátu na růst ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	42
4.4.3 Test vlivu těžkých kovů (Cd, As) na růst ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	43
4.4.4 Stanovení těžkých kovů atomovou absorpční spektrometrií (AAS) v suché biomase ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ).....	44
4.4.5 Stanovení chlorofylů spektrofotometricky.....	46
4.5 VYHODNOCENÍ PARAMETRŮ.....	48
<b>5 VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST .....</b>	<b>51</b>
5.1 KONTROLA KVALITY SEMEN A OPTIMALIZACE POSTUPU KULTIVACE .....	51
5.2 VLIV KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU NA RŮST JEČMENE SETÉHO ( <i>HORDEUM VULGARE</i> ) .....	53
5.3 VLIV Cd A Cd V KOMBINACI S KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM NA RŮST JEČMENE SETÉHO ( <i>HORDEUM VULGARE</i> ) .....	54
5.4 VLIV As A As V KOMBINACI S KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM NA RŮST JEČMENE SETÉHO ( <i>HORDEUM VULGARE</i> ) .....	57
5.5 STANOVENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIÍ (AAS) V SUCHÉ BIOMASE .....	60



5.6	FTIR ANALÝZA .....	61
5.7	STANOVENÍ CHLOROFYLŮ SPEKTROFOTOMETRICKY .....	63
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>76</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>79</b>

## ÚVOD

Znečištění životního prostředí těžkými kovy zůstává aktuálním problémem již několik desítek let. Z důvodu neznalosti minulých generací byly tyto látky používány ve velkém množství a byly uvolňovány do životního prostředí. Závažným problémem je skutečnost, že těžké kovy jsou persistentní, relativně mobilní, mají schopnost hromadit se v životním prostředí a biologických organismech a následně kontaminují potravní řetězec. Proto je jejich odstranění vždy obtížné.

Fytoremediace je jednou z ekologicky šetrných metod, jak tyto látky odstraňovat. Některé rostliny mají akumulární vlastnosti, mohou absorbovat těžké kovy z půdy, vody nebo vzduchu a akumulovat je v rostlinných tkáních, případně přeměnit tyto polutanty na formu, která je pro životní prostředí méně toxická. Pro podporu vitality rostlin lze použít bílkovinné hydrolyzáty. Je známá schopnost bílkovinných hydrolyzátů zvyšovat odolnost rostlin vůči různým druhům stresu a snižovat negativní dopady těžkých kovů na rostliny (Bartucca et al., 2022). Nicméně dosud nebylo vědecky prokázáno, že by tyto hydrolyzáty zároveň zvyšovaly schopnost rostlin akumulovat a eliminovat tyto kontaminanty z prostředí.

Cílem práce je ověřit, zda lze použít keratinový hydrolyzát živočišného původu ke zvýšení tolerance pěstovaných rostlin oproti těžkým kovům; zhodnotit účinky bílkovinného hydrolyzátu vyrobeného z druhotné suroviny na vybrané druhy rostlin, nalézt optimální koncentraci hydrolyzátu podporující růst rostlin.

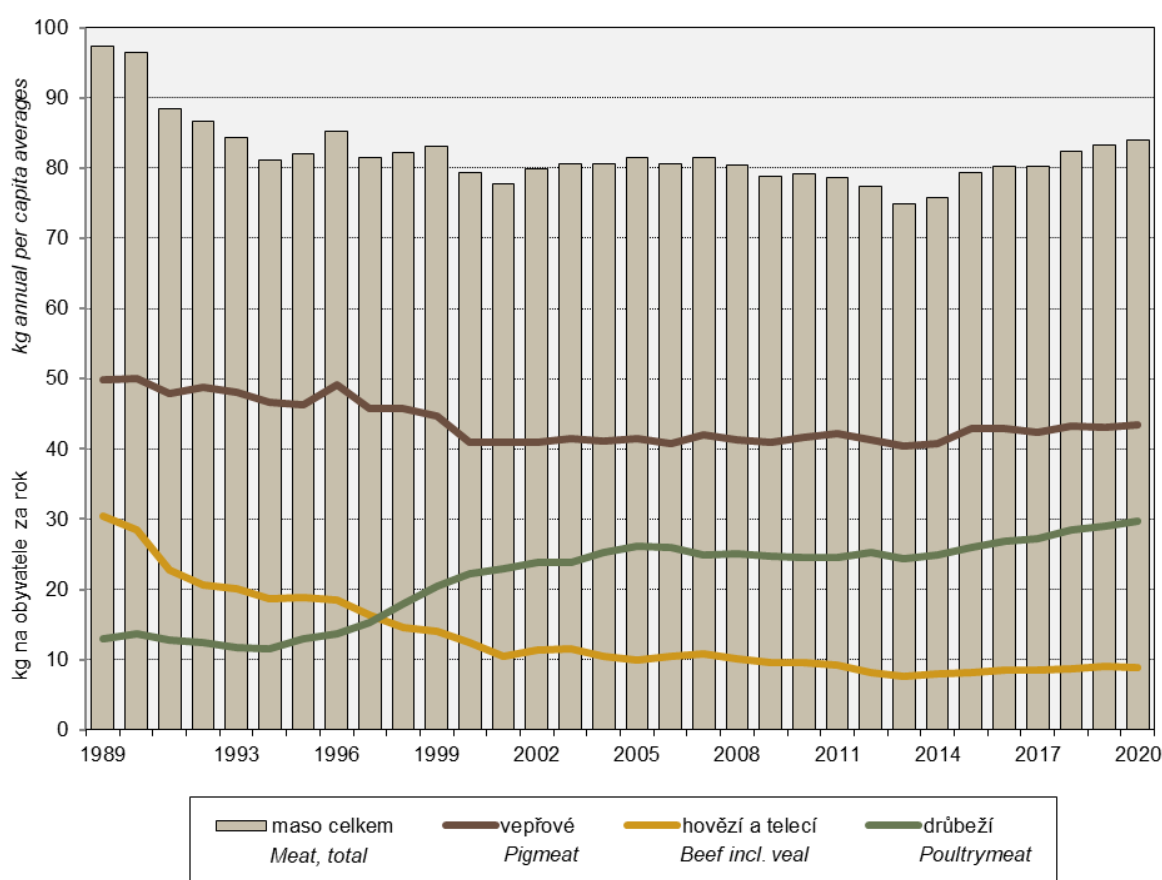
Tato studie je důležitá z hlediska významného příspěvku k ochraně životního prostředí, neboť využívá keratinový hydrolyzát získaný z kuřecího peří, které je vedlejším produktem, a tím přispívá k efektivnímu využití odpadu.

Kombinace ekologicky šetrného přístupu k remediaci kontaminovaných oblastí s efektivním využitím odpadních materiálů může být rozhodujícím faktorem k udržitelnější budoucnosti.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 TYPY BÍLKOVINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ A JEJICH CHARAKTERISTIKA

Životní úroveň a rostoucí populace obyvatelstva je přímo úměrná nárůstu spotřebního zboží a spotřeby potravin, zejména masa. Například, podle údajů Českého statistického úřadu drůbeží maso stále zůstává oblíbeným mezi občany ČR a jeho spotřeba neustále roste. Uvádí se, že za posledních 10 let se množství zkonsumovaného drůbežního masa zvýšilo o 5,3 kg na 29,8 kg na obyvatele (Celková spotřeba potravin loni vzrostla, 2021).



Obrázek 1 Průměrná spotřeba masa od roku 1989 do roku 2020 uváděná v hodnotě na kosti<sup>1</sup> na obyvatele za rok (Převzato Spotřeba masa v hodnotě na kosti (na obyvatele za rok), (2021))

<sup>1</sup> rovná se ekvivalentu váhy jatečně upravených těl (maso domácích kopytníků), u drůbežního masa se jedná o hmotnost drůbeže po vyjmutí orgánů na jatcích. Maso v hodnotě na kosti je jatečná mrtvá váha masa, které bylo získáno jako půlky, čtvrtě či kusy masa. Zahrnuje i podmíněně požitelné maso (nucený výsek) (NÁPLŇ PUBLIKOVANÝCH POLOŽEK, 2021).

Živočišná výroba, zpracování a průběžné zvýšení spotřeby masa má za následek vznik velkého množství vedlejších produktů živočišného původu v podobě odpadů jako jsou kosti, kůže, vnitřnosti. Tyto při výrobě nevyužitelné části (až 50 % hmotnosti živočicha) v některých případech představují vážný ekonomický a ekologický problém. Nicméně jak již prokázala celá řada studií, mohou být tyto odpady po jejich úpravě a zpracování významným zdrojem dobře dostupné a levné suroviny pro celou řadu odvětví – zemědělství, kosmetika aj.

Z vedlejších produktů výroby zůstávají materiály bohaté na kolagen, který je obsažen v kůži, šlachách, chrupavce či kostech, (drůbeží, hovězí, prasečí, koňský, rybí ze sladkovodních ryb a mořský z různých mořských živočichů), elastin, který najdeme ve vazech (z hovězího dobytka, prasat a drůbeže), nebo keratin, jehož zdrojem jsou peří, prasečí srst, vlna, kopyta a drápy. Neustálý růst drůbežářského průmyslu ukazuje na přímé zvýšení produkovaných odpadů z drůbežáren a jatek, nejvíce vyprodukovaného pevného odpadu připadá na peří. Až 10 % celkové hmotnosti drůbeže zaujímá peří (Grazziotin et al., 2006). To znamená, že denně v rámci celé ČR po zpracování 250 tis. kusů drůbeže na jatkách je vyprodukováno 15–20 tun peří. Jen část peří se pere a zpracovává v textilním průmyslu (používá se na výplň polštářů volného čalounění, prošívání přikrývek a ozdobných polštářů, péřových bund), při vyrábění sportovního vybavení (šípky do luků, rybářské návnady) atd. Avšak většina peří zůstává nevyužita a jako odpad se spaluje nebo ukládá na skládku (Gupta et al., 2023). Taková likvidace není užitečná, poněvadž cenné látky obsažené v peří zůstávají nevyužity.

Studie zaměřené na využití odpadních materiálů z masného průmyslu, především kuřecího peří, jako obnovitelného zdroje, jsou předmětem zájmu mnoha studií. Jednou z možností je hydrolyza, která představuje klíčový proces při získávání bílkovinných hydrolyzátů, které nacházejí využití např. jako biostimulanty nebo biohnojiva pro podporu růstu rostlin.

Bílkovinné hydrolyzáty představují složité směsi peptidů a aminokyselin vytvořených štěpením peptidových vazeb v polypeptidovém řetězci. Jsou vyráběny chemickými, enzymatickými nebo mikrobiálními metodami. Při rozhodování, která metoda bude nejvhodnější pro daný typ odpadu, a volbě postupu hydrolyzy jsou klíčovými faktory vlastnosti zpracovávaného odpadu, dostupnost a cena činidel, případně jejich toxicita, požadovaná kvalita výsledného hydrolyzátu a následná aplikace vyrobeného produktu.

## 1.1 Hydrolyzáty na bázi keratinu

Keratin patří mezi nerozpustné fibrilární (vláknité) proteiny syntetizované v epitelálních buňkách vyšších obratlovců, které plní strukturální a ochranné funkce. Jako jiné proteiny i keratiny se mohou lišit svou strukturou. Obecně se keratiny dělí do tří skupin: alfa-, beta- a gama-keratiny.

- $\alpha$ -formy keratinu se vyskytují u savců, jsou součástí rohů, kůže, vlny, kopyt a mají dvě nejdůležitější biologické vlastnosti – nerozpustnost a pevnost v ohybu.
- $\beta$ -formy keratinu jsou nejčastější složkou peří, šupin, zobů u plazů a ptáků.
- Molekuly  $\gamma$ -formy jsou amorfní matrixové proteiny (do 15 kDa), nejčastěji jsou určeny jako spojovací materiál v keratinových vláknech pro tvorbu makrofibril vlasů, vlny a srsti (Krejčí, 2014).

Keratin může být aplikován v různých oblastech. Významné vlastnosti keratinových materiálů, jako jsou biokompatibilita, pórovitost, biodegradabilita, bobtnavost, schopnost absorpce tekutin a mechanické vlastnosti, umožňují nalézt uplatnění v oblasti regenerativní medicíny (při regeneraci svalů, nervů, kostí a kloubů, včetně zubních implantátů) a tkáňového inženýrství.

V přehledové práci Timorshina a kol. (2022) byla také popsána schopnost keratinových materiálů adsorbovat různá barviva a těžké kovy, což podle autorů lze potenciálně využít pro sanaci odpadních vod kontaminovaných těmito látkami. Avšak keratinové adsorbenty mají špatné mechanické vlastnosti, což lze vyřešit mísením s jinými polymery, jako je např. celulóza. Vyřešení problému tímto způsobem prokázalo účinnost při zlepšování mechanických a regeneračních vlastností bioadsorbentu na bázi keratinu (Timorshina et al., 2022).

Kromě biochemických vlastností je další výhodou keratinů jejich nízká cena, protože jsou tyto proteiny získávány zejména ze zemědělského odpadu. Např. podle Callegaro a kol. (2019) peří obsahuje 90 % keratinového proteinu ( $\alpha$ -keratin 41 až 67 %,  $\beta$ -keratin 33 až 38 %, zbytek připadá na amorfni keratin).

Jedním ze způsobů efektivního využití pevného keratinového odpadu je příprava rozpustného keratinu (keratinových hydrolyzátů), což je vlastně směs aminokyselin a oligopeptidů keratinového původu. Keratinové hydrolyzáty se liší svým složením v závislosti na způsobu jejich výroby. Hydrolyza prováděná chemickou cestou je obvykle

jednodušší a rychlejší než cestou enzymatickou/mikrobiální, má vysoké výtěžky, ale zahrnuje použití silných kyselin, alkalických nebo jiných činidel (například redukčních činidel), často při vysokých teplotách a tlaku vyžadujících vysoké energetické vstupy. Avšak chemická hydrolýza probíhá nespecificky, což může vést k destrukci aminokyselin a produkci látek s vysokým obsahem popela. Takový nedostatek může ovlivnit čistotu a kvalitu výsledných hydrolyzátů, což může být nežádoucí především v aplikacích, kde je vyžadována vysoká čistota produktu.

Z tohoto důvodu se v poslední době pro zpracování keratinových materiálů využívá enzymová hydrolýza, při které nejsou používány vysoké koncentrace agresivních chemikálií a celý proces se koná za spolupůsobení nižších teplot a atmosférického tlaku. Enzymatické metody hydrolýzy jsou častěji preferované, protože nabízí řadu výhod včetně selektivity, šetrných procesních podmínek, zachování aminokyselin, snadné kontroly stupně hydrolýzy a následné inaktivace enzymů. Ačkoli je enzymatická hydrolýza obvykle rychlá a probíhá během několika hodin, hlavní nevýhodou stále zůstává omezená dostupnost komerčních specifických proteáz, jako jsou například keratinázy, určené pro hydrolýzu keratinových substrátů (Callegaro et al., 2019). Nicméně cena enzymů je na takové úrovni, že získání hydrolyzátu enzymovou technologií je méně finančně nákladné ve srovnání s použitím kyselé či alkalické hydrolýzy (Mokrejš et al., 2014).

Hydrolýza bílkovin zprostředkovaná mikroorganismy je závislá na mikrobiálním růstu a sekreci extracelulárních proteáz s keratinolytickou aktivitou a dalších enzymů. Ve srovnání s enzymatickými a chemickými metodami mikrobiální způsob má prodlouženou dobu hydrolýzy a část uvolněných aminokyselin a peptidů mikroorganismy spotřebovávají k udržení svého růstu (Callegaro et al., 2019). Vytvořeny jsou také kombinované metody výroby hydrolyzátů s použitím jak keratináz tak i alkálií a redukčních činidel, jako jsou siřičitany.

Podle studie Sionkowska a kol. (2011) ultrafialové (UV) záření způsobuje nepatrné zvýšení celkové absorpce keratinových hydrolyzátů, zejména v rozmezí 250-280 a 320-410 nm, což ukazuje na možnost modifikace molekulové hmotnosti a vlastností keratinových hydrolyzátů. Fotochemická degradace keratinových hydrolyzátů může být velmi užitečná pro proces přípravy keratinových hydrolyzátů s nízkou molekulovou hmotností, která je nižší ve srovnání s chemicky ošetřenými hydrolyzáty. Keratinové hydrolyzáty modifikované pomocí UV záření nacházejí uplatnění v kosmetických aplikacích.

Perspektivním uplatněním je využití keratinových hydrolyzátů v obalovém průmyslu pro přípravu biodegradabilních (a jedlých) filmů, vláken, fólií či povlaků na maso, ryby a drůbež (Mokrejš et al., 2014).

Díky pokroku v enzymové hydrolýze a zájmu spotřebitelů hydrolyzáty jsou vhodné pro využití v různých odvětvích průmyslu, například v lékařství (tkáňové inženýrství), při výrobě kosmetických přípravků (péče o vlasy a pokožku), v zemědělství jako dusíkatá hnojiva a růstové stimulanty, v krmivářství jako zdroj bílkovinného krmiva pro dobytek (Mokrejš, Langmaier, 2008).

Použití keratinových hydrolyzátů jako součásti mikrobiálního média přispívá k udržitelnému využívání živočišného odpadu. Aminokyseliny a oligopeptidy obsažené v hydrolyzátech mohou sloužit jako levný zdroj organického uhlíku a dusíku pro růst mikroorganismů.

## 1.2 Hydrolyzáty na bázi kolagenu

Kolagen je základní stavební jednotkou všech živých organismů, patří mezi fibrilární bílkoviny, pro které je charakteristická vláknitá struktura. Kolagen tvoří přibližně 30 % všech živočišných bílkovin a je součástí kůže, chrupavek, kostí, je obsažený v rohovce, cévách, meziobratlových ploténkách a střevech. Typickými surovinovými zdroji kolagenu jsou šlachy z hovězího dobytka, ovčí kůže, hovězinová škára, vepřovicová kůže a kolagenní extrakty z kostí. Dalším poměrně významným zdrojem pro výrobu kolagenu je odpad z rybářského průmyslu. Kolagen lze získat z různých komerčních ryb, hvězdic, žraloků, mořských ježků, medúz a hub (Timorshina et al., 2022).

Kolagen našel své uplatnění v různých oblastech. Díky své vláknité podstatě, kontrolovatelnému sítování a možností rozkladu enzymy lidského těla kolagen má velmi významné použití v lékařství. Na vlastnosti tohoto materiálu jsou kladeny vysoké nároky, musí být biokompatibilní, permeabilní, pórovitý, mít dobré mechanické vlastnosti jako je pevnost, protože kolagenní preparáty jsou aplikovány na regeneraci kloubů a musí odolat vznikající zatěžující síle při jejich činnosti. Kolagen může být v různých fyzikálních formách (gel, roztok, prášek, filmy, membrány, rouna atd.) a má širokou aplikaci. Kolagenní roztok se uplatňuje jako expandér plasmy, injekce pro léčbu kosmetických defektů, nosič léčiv. Gelová forma se využívá v krémech pro kosmetiku a taky jako náhrada sklivce. Kolagenní vlákna se používají jako cévní náhrady, chirurgický šicí materiál, tkaný či pletený nosič tkáně a protézy chlopní (Mokrejš, Langmaier, 2008). Nerozpustnou formou bílkoviny jsou kolagenové houby získané zpěňováním roztoku želatiny. Schopnost absorbovat tekutiny a



vysoká adhezivita umožňuje jejich využití jako krycí materiál popálenin, otevřených ran atd. Houby efektivně chrání rány před mechanickým traumatem, vysycháním a bakteriálními infekcemi.

Díky vysoké adsorpční kapacitě a malým rozměrům jsou kolagenové nanočástice využívány jako systémy pro cílené podávání léčiv (Timorshina et al., 2022).

Kolagen se hojně používá v kosmetice a estetické medicíně. Díky své schopnosti regulovat obsah vlhkosti a udržení pružnosti v pokožce je významným komponentem kosmetických přípravků ve formě masek, gelů, krémů k péči o tělo i vlasy. Lze jej také použít ve formě injekcí jako podkožní výplně.

Možnosti využití kolagenu v medicíně, farmacii a kosmetice jsou podporovány podobností zvířecího kolagenu s lidským kolagenem, což minimalizuje imunitní reakce.

V potravinářském průmyslu má řadu aplikací:

- jako výchozí surovina pro výrobu želatinových výrobků
- výroba jedlých obalů pro balení masa, uzenin, ryb a dalších výrobků
- využití v tekutých proteinových doplňcích stravy
- modifikace struktury při výrobě pekárenských produktů
- čištění piva
- součást potravinářských povlaků
- forma kolagenních kapslí nebo prášků jako doplňku stravy
- umožnění požadovaného tvaru a struktury masných výrobků
- regulace viskozity ovocných nápojů.

Vzhledem k masovému využívání v potravinářství musí vyrobený kolagen splňovat přísné hygienické předpisy kladené na jeho stupeň čistoty, což se následně odráží v ceně produktu.

Obecně potravinářský kolagen musí splňovat následující požadavky:

- kůže musí pocházet jen z dobytka, který byl zpracován v masném průmyslu a byl veterinárně zkontrolován ze strany inspekčních orgánů
- musí být zajištěna absence jakýchkoliv kontaminujících toxických chemikálií a pesticidů
- nesmí obsahovat žádné cizorodé látky, jako je špína, hmyz, prach apod.

- kolagen musí být bez jakéhokoliv mikrobiálního napadení
- celkový maximální obsah těžkých kovů nesmí přesáhnout 10 ppm (parts per million).

Kolagen je využíván i pro krmné účely psů a koček. Pro výrobu bílkovinného krmiva se zpracovávají klišovky z hovězího a jiného dobytka spolu s přísadami (barviva, chuťové látky, aroma) (Mokrejš, Langmaier, 2008).

### 1.2.1 Želatina

Želatina je ve vodě rozpustný protein představující heterogenní směsi peptidů, mající schopnost za specifických podmínek tvořit transparentní gel. Získává se z nativního kolagenu (285-300 KDa), což je primární forma kolagenu v jeho přirozeném stavu, který je přítomen v kostech, šlachách a kůži zvířat. Velký potenciál je ve zpracování rybí želatiny, a to hlavně z toho důvodu, že po zpracování ryb tvoří odpad obsahující kolagen zhruba 21 % (kůže, kosti, ploutve) (Karim, Bhat, 2009).

Obecně se želatina získává ze zvířecích kostí, kůží a šlach štěpením kolagenu při extrakci kolagenních materiálů vodou při zvýšené teplotě (nad 40 °C). Původní surový materiál prochází předzpracováním v kyselém či alkalickém prostředí, po němž v několika fázích následuje postupné extrahování želatiny za zvyšující se teploty dosahující až 90 °C. Po extrakci pro zajištění požadované čistoty produktu a vlastností následuje filtrace, zahuštění, tvorba gelu, sušení, a nakonec mletí na částice požadované velikosti.

Želatiny mají široké spektrum použití:

- cca 10 % celosvětové produkce zaujímá technická želatina pro potřeby technické praxe
- cca 60 % – jedlá želatina, která je aplikovaná v potravinářském průmyslu. Z důvodu schopnosti tvorby pěny se používá při výrobě „pěnových sladkostí“ typu marshmallow. V pekárenství se využívá jako stabilizátor
- fotografický průmysl využívá fotografickou želatinu, což je cca 15 %
- farmaceutický průmysl využívá farmaceutickou želatinu, cca 15 %. Využívá se k výrobě měkkých a tvrdých želatinových tablet, kapslí a expandérů plasmu. (Mokrejš, Langmaier, 2008).

### 1.2.2 Hydrolyzát kolagenu

Pro výrobu kolagenních hydrolyzátů je možné použít jakékoliv odpady bohaté na kolagen, nejčastěji se využívají hovězí a vepřové kůže. Ve srovnání s želatinou představuje hydrolyzát kolagenu směs krátkých nízkomolekulárních peptidů s molekulovou hmotností v rozmezí 3-6 kDa.

Získání hydrolyzátu kolagenu se provádí jak v kyselém prostředí (zředěná HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), tak v alkalickém prostředí (KOH, NaOH nebo Ba(OH)<sub>2</sub>), či za působení enzymů (energeticky méně náročný způsob), případně jejich kombinace (Mokrejš, Langmaier, 2008).

K enzymatické hydrolýze se obvykle používají proteolytické enzymy, jako jsou alkaláza, trypsin, pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, papain, neutráza, při určité teplotě a optimální hodnotě pH. Výzkumníci také doporučují použití mikrobiálních kolagenáz. Rozpustnost a funkční aktivita hydrolyzátu (antioxidační, antimikrobiální) souvisí s typem a stupněm hydrolýzy a také s typem enzymu použitého v procesu (León-López et al., 2019). Intenzivní enzymatická hydrolýza vede k větší fragmentaci molekul. Pokud se použije enzymatická metoda hydrolýzy na vyčištěnou kůži bez podkožního vaziva, lze získat hydrolyzát kolagenu spolu s hydrolyzátem keratinu a elastinu.

Prostřednictvím alkalické hydrolýzy hovězích kůží lze získat nejen hydrolyzát kolagenu, ale také elastinu nebo jejich směs, přičemž výsledný produkt závisí na konkrétním postupu extrakce. Nicméně využití chemické hydrolýzy má několik nevýhod, jako je žíravost (po neutralizaci se vytváří vysoká koncentrace solí) a nižší nutriční vlastnosti v konečném produktu. Výhodou všech těchto typů hydrolyzátů je jejich snadná rozpustnost ve vodě i alkoholu a schopnost vytvářet čisté a průhledné roztoky bez zápachu, bezbarvost, průhlednost, schopnost emulgace a stabilizace (Mokrejš, Langmaier, 2008).

V poslední době se vyvíjí proces extrakce kolagenu pomocí ultrazvuku (frekvence  $\geq 20$  kHz). Ultrazvuk vyvolává intenzivní turbulenci v kapalině, což zlepšuje přenos hmoty, urychluje chemické reakce a tím zkracuje dobu trvání procesu. Zvýšení výtěžnosti je možné dosáhnout zvýšením amplitudy ultrazvuku. Nicméně intenzivní ultrazvuk potenciálně může poškodit strukturu bílkovin. Podle Matinong a kol. (2022) kombinace ultrazvuku s enzymy zkrátila dobu hydrolýzy, zvýšila účinnost extrakce a čistotu kolagenu ve srovnání s procesem zahrnujícím pouze enzym. Nicméně autoři upozorňují, že je potřeba další výzkum v oblasti optimalizace celého procesu (doba trvání, amplituda

ultrazvuku, teplota, koncentrace enzymu) tak, aby docházelo k minimálnímu poškození struktury kolagenu (Matinong et al., 2022).

Konečné funkční vlastnosti kolagenového hydrolyzátu závisí na zdroji, extrakční metodě a použitém enzymu, obvykle je biologicky dostupnější díky svým menším molekulárním rozměrům, což znamená, že může být snadněji vstřebáván a využíván. Díky svým vlastnostem, jako jsou bezbarvost, nízká viskozita ve vodných roztocích, neutrální zápach, průhlednost, emulgace a stabilizace, tvorba pěny a filmu, rozpustnost, smáčivost, dispergovatelnost, nosič látek s nízkou alergenitou a také antimikrobiální a antioxidační aktivita, hydrolyzáty našly široké uplatnění v praxi.

Hydrolyzát kolagenu má dobré biologické funkce jako je schopnost zadržovat vodu, absorbovat a zadržovat vlhkost, působit proti stárnutí pokožky pro kosmetické aplikace (León-López et al., 2019). Využívá se v potravinářském průmyslu (např. jako složka kořenících směsí, náhrada sušeného mléka, nosiče antioxidantů, regulátor viskozity ovocných nápojů), při výrobě tenzidů, jako růstové stimulanty pro rostliny (dodávají se na trh v podobě kapalných koncentrátů nebo pevných substrátů), mikroenkapsulace v zemědělství. Také mají další průmyslové aplikace. Používají se jako plniva do plastů a gumárenských směsí (při výrobě pneumatik), adhesiva, při výrobě cementu, jako absorbent formaldehydu při výrobě dřevotřískových desek (Mokrejš, Langmaier, 2008).

V současné době hydrolyzáty slouží ve výrobcích jako emulgátory, koloidní stabilizátory, pěnidla, zjemňující látky a mikroenkapsulační činidla. Používají se k výrobě biodegradabilních obalových materiálů a hydrogelů. Rostoucí zájem o tyto materiály úzce souvisí s rostoucím trendem nahrazovat látky syntetické látkami přírodními (Gómez-Guillén et al., 2011).

## 2 VLIV BÍLKOVINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ NA ROSTLINY

Látky přírodního původu nabízejí vynikající možnosti pro péči o zemědělské plodiny, poněvadž jsou přirozeně šetrné k životnímu prostředí.

Jak vyplývá z předcházejících kapitol a řady výzkumných prací (Taskin, Kurbanoglu, 2011), kuřecí peří lze považovat za významný zdroj proteinového hydrolyzátu. Toto peří obsahuje klíčové minerální prvky, jako je vápník, fosfor a hořčík, a také bílkovinný keratin, který je bohatý na glutamát, cystein, glycin, arginin a fenylalanin (Taskin, Kurbanoglu, 2011).

### 2.1 Hnojiva bohatá na dusík

Dusík (N) je jednou z hlavních živin, kterou rostliny potřebují pro tvorbu buněčného materiálu a k zajištění správného funkčního metabolismu pro svůj růst a vývoj. Aby se zvýšila úroda a kvalita plodin, dusík je často přidáván do půdy jako součást komerčních hnojiv tzv. NPK hnojiva.

V případě peří, které obsahuje vysoké množství dusíku, skoro 15 % (hmotnostně), není efektivní jeho přímá aplikace, jelikož tento dusík je vázán v keratinové struktuře a není snadno dostupný mikroorganismům pro rozklad a uvolnění ve formě, kterou mohou rostliny využít. Dostupnější formy dusíku, které jsou schopné rostliny přijmout, lze získat zpracováním peří chemickou, enzymatickou nebo mikrobiální cestou, tedy vyráběním keratinového hydrolyzátu, který je řazen do kategorie obnovitelných zdrojů dusíku pro rostliny a představuje potenciální zemědělské využití jako biohnojivo. Vzhledem k nízkému poměru uhlíku a dusíku (C/N) v hydrolyzátech probíhá rychlá mineralizace organického N půdní mikroflórou, což uvolňuje minerální N pro příjem rostlinami. Avšak rychlost mineralizace N může být ovlivněna i jinými faktory, např. fyzikální a chemické vlastnosti hydrolyzátů a půdy.

Ve studii Callegaro a kol. (2019) je uvedeno, že jsou široce zkoumány metody zahrnující mikrobiální fermentaci s mezofilními bakteriemi. Tyto metody nabízí šetrný a udržitelný způsob nakládání s odpady, a to jak z hlediska ochrany životního prostředí, tak i z ekonomického hlediska. Při výrobě hydrolyzátu mikrobiální fermentací se využívá 5-20 g peří/l a kultivace obvykle probíhá při 30-40 °C, 24 až 96 h. Obvykle po aplikaci hydrolyzátu bylo pozorováno zlepšení růstu a životních funkcí rostlin. Podobné účinky byly sledovány po aplikaci hydrolyzátů získaných termochemickými metodami. Studovanými rostlinami

byly zejména bengálský hrách, pšenice, žito, fazole, rýže a jiná zelenina. Jak je uvedeno v přehledové práci Callegaro a kol. (2019) a v Tab. 1, pozitivní účinek se obvykle projevil zvýšenou klíčivostí semen, na délce kořenů a jejich hmotnosti, kvalitě a délce výhonků. Zaznamenána byla i zvýšená produktivita biomasy.

Tabulka 1 Potenciální možnosti využití hydrolyzátů jako hnojiv (převzato a upraveno Callegaro a kol. (2019))

Keratinový zdroj	Výroba hydrolyzátu			Aplikace jako hnojiva	
	Metoda	Agent/čínidlo	Podmínky	Aplikace	Účinnost (ve srovnání s kontrolou, pokud není uvedeno jinak)
Celé peří	Mikrobiální (v kultivačním mediu)	<i>Paenibacillus woosongensis</i> TKB2	7,5 g/l peří, 30 °C, pH 8,5, 48 h	do půdy	Vyšší klíčivost a hmotnost kořenů (mokrý a suchá biomasa) a vyšší počet kořenových hlíz u bengálského hrachu
		<i>Thermoactinomyces sp.</i> RM4	20 g/l peří, 60 °C, pH 10,0, 96 h	do půdy	Vyšší klíčivost a hmotnost kořenů (mokrý a suchá biomasa) u bengálského hrachu
		<i>Amycolatopsis sp.</i> MBRL 40	5 g/l peří, 30 °C, 120 h	do půdy	Růst rýže a suchá biomasa (kořenů a výhonků) byly podobné jako při použití močoviny (referenční hnojení)
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DHHJ	26,7 g/l peří, 40 °C, pH 7,8, 72 h	na listy	Vyšší růst čínského zelí
		<i>Bacillus polymyxa</i> B20	10 g/l peří, 30 °C, pH 7.2, 144 h	do půdy	Čerstvá hmotnost a obsah chlorofylu v listech rajčat, okurek a bílého zelí podobné referenčnímu hnojení
		<i>Chryseobacterium sp.</i> RBT	10 g/l peří, 37 °C, pH 7.5, 30 h	do půdy/na listy	Dřívější kvetení banánovníků, dřívější sklizeň, vyšší výnosy banánů

Tabulka 1 – POKRAČOVÁNÍ Potenciální možnosti využití hydrolyzátů jako hnojiv (převzato a upraveno Callegaro a kol. (2019))

Keratinový zdroj	Výroba hydrolyzátu			Aplikace jako hnojiva	
	Metoda	Agent/činidlo	Podmínky	Aplikace	Účinnost (ve srovnání s kontrolou, pokud není uvedeno jinak)
	Mikrobiální (kultivace v pevné fázi)	<i>Streptomyces sampsonii</i> GS 1322	500 g peří, 60 % vlhkost, pH 8,0, 24 dní	do půdy	Vyšší klíčivost a růst pšenice
	Hydrotermální úprava	Nasycená pára	peří:voda = 1:3, 160-180 °C, 0,6-0,9 MPa, 30 min	do půdy	Podobná listová plocha, hmotnost sušiny a obsah chlorofylu pačule obecné; podobné trendy pro zvýšení obsahu chlorofylu, délky lusků, výnosu z rostliny a hmotnosti sta semen fazole mungo při použití hydrolyzátů peří a drůbeží podestýlky (5:1) s 50 % doporučeného NPK ve srovnání se 100 % hnojením NPK.
	Termochemické	Alkalická hydrolyza	peří:voda = 1:5, 0,1 g Ca(OH) <sub>2</sub> /g suchého peří, 180 °C, 1 MPa, 30 min	—	Sledovány fyto toxické a nefyto toxické účinky na index klíčivosti semen špenátu japonského v závislosti na aplikované dávce (pozitivní účinek byl pozorován při aplikaci 150 ppm TOC)
Mleté peří	Mikrobiální (v kultivačním mediu)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 6B	5 g/l mletého peří, 37 °C, pH 7,2, 12 h	do půdy	Vyšší klíčivost a růst fazolí mungo ve srovnání s nehnojenou kontrolou



Tabulka 1 – POKRAČOVÁNÍ Potenciální možnosti využití hydrolyzátů jako hnojiv (převzato a upraveno Callegaro a kol. (2019))

Keratinový zdroj	Výroba hydrolyzátu			Aplikace jako hnojiva	
	Metoda	Agent/činidlo	Podmínky	Aplikace	Účinnost (ve srovnání s kontrolou, pokud není uvedeno jinak)
		<i>Bacillus licheniformis</i> ASU	10 g/l mletého peří, 30 °C, pH 7,2, 120 h	do půdy	Vyšší růst a hmotnost sušiny (kořenů a výhonků) a zvýšený počet a hmotnost kořenových hlíz u bobu ve srovnání s nehnojenou kontrolou; synergické účinky hydrolyzátu a inokulace mykorhizními houbami
		<i>Aspergillus niger</i>	20 g/L mletého peří, 30 °C, pH 5.7, 168 h	do půdy	Vyšší růst a výnos hrachu
		<i>Bacillus pumilis</i> KHS-1	5 g/L mletého peří, 40 °C, pH 6.0, 72 h	do půdy	Růst a hmotnost sušiny (kořenů a výhonků) mrkve a čínského zelí podobné referenčnímu hnojení
		<i>Thermoactinomyces</i> sp. 3H, 8H a M4 (konsorcium)	7 g/l mletého peří, 55 °C, pH 7,2, 72 h	do půdy	Vyšší klíčivost a růst žita
	Enzymatická	<i>Bacillus licheniformis</i> AS-S24-I keratináza imobilizovaná na magnetických nanočásticích Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	20 g/l mletého peří, 45 °C, pH 9,0, 48 h	do půdy	Klíčení, růst a čerstvá biomasa bengálského hrachu podobné nebo vyšší
	Termochemická	Kyselá hydrolyza	30 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 80 °C, 4 h	do půdy	Mokrý a suchý hmotnost rostlin řepky podobná jako při referenčním hnojení (močovina a dusičnan amonný).

Tabulka 1 – POKRAČOVÁNÍ Potenciální možnosti využití hydrolyzátů jako hnojiv (převzato a upraveno Callegaro a kol. (2019))

Keratinový zdroj	Výroba hydrolyzátu			Aplikace jako hnojiva	
	Metoda	Agent/činidlo	Podmínky	Aplikace	Účinnost (ve srovnání s kontrolou, pokud není uvedeno jinak)
Vlněný odpad	Termochemická	Alkalická hydrolyza	100 g/l vlněného odpadu, 0,15 M KOH-0,05 M NaOH, 120 °C, 20 min	do půdy	Vyšší klíčivost, růst a čerstvá biomasa žita
Vlna	Chemická + ultrazvuk	Alkalická hydrolyza	20 g/l vlny, 30 g/l KOH, 2,4 g/l NaOH, 24 h + akustická kavitace (20 kHz, 40 % maximálního výkonu 750 W, 30 min	do půdy	Vyšší klíčivost a růst pšenice
	Hydrotermální	Přehřátá voda	poměr vlna: louh ~ 1, nasycená pára při 170 °C, 7 barů, 60 min)	—	Vyšší klíčivost a délka kořenů řeřichy seté ( <i>Lepidium sativum</i> )

Bílkovinné hydrolyzáty potenciálně mohou působit jako rostlinné biostimulanty, poněvadž směsi polypeptidů, oligopeptidů a aminokyselin získané částečnou hydrolyzou bílkovin jsou přijímány přímo kořeny a listy rostlin a přenášeny do dalších rostlinných pletiv (Colla et al., 2015). Významnou aminokyselinou je z tohoto pohledu tryptofan, který je základní aminokyselinou pro syntézu kyseliny indolové (přírodní fytohormon).

Kyselina indol-3-oxidová (IAA) je jedním z nejdůležitějších přírodních auxinů v rostlinách a hraje klíčovou roli v mnoha procesech růstu a vývoje rostlin. Biologické účinky tohoto přirozeného hormonu rostlin jsou široce rozmanité a zahrnují kontrolu prodlužování buněk, diferenciaci tkání, dělení buněk, a také regulaci apikální dominance (Súkeník, 2023). IAA přispívá ke stimulaci prodlužování buněk koleoptilií a stonku rostliny ve směru, který vede k růstu stonku, což je zásadní pro vertikální růst rostlin. Současně stimuluje buněčné dělení, čímž umožňuje rozrůstání rostliny a tvorbu nových tkání. Kromě toho, má vliv na zakládání sekundárních kořenů, což je podstatné pro zajištění příjmu vody a živin z půdy.

Gezgincioğlu a Atici (2023) získali bílkovinný hydrolyzát z kuřecího peří alkalickou hydrolyzou, který obsahoval 19 proteinogenních a 3 neproteinogenních aminokyselin a také pro rostliny užitečné soli. Jako rostlinný materiál pro pokus byly použity odrůdy Altindane a Bezostaya pšenice (*Triticum aestivum L.*). Během pěstování plodiny jsou rostliny vystavovány působení nežádoucích podmínek prostředí včetně stresu z nízkých teplot, a proto výzkumníci zjišťovali vliv hydrolyzátu na rostliny a sledovali reakci na stres při nízkých teplotách.

Vzorky semenáčků pšenice bez přidaného hydrolyzátu z kuřecího peří sloužily jako kontrola. Po jednorázovém nastříkání 0,1 % vodného roztoku proteinového hydrolyzátu na 11denní semenáčky pšenice (aplikace na listy) byly ošetřené a neošetřené rostliny přeneseny do chladných podmínek na 3 dny. Konkrétně teplota během dne byla 5 °C a během noci 2 °C.

Po 3 dnech byly všechny rostliny sklizeny a použity pro biochemické a fyziologické analýzy. Růst rostlin byl stanoven měřením délky kořenů a stonků a poté byla stanovena jejich sušina při 70 °C. Autoři ve své práci uvádí, že u rostlin ošetřených hydrolyzátem došlo ke zlepšení růstových parametrů rostlin, a to i u rostlin, které byly vystaveny chladu. Po aplikaci hydrolyzátu došlo také u rostlin ke zvýšení obsahu fotosyntetického barviva, volného prolinu a rozpustného cukru, zatímco obsah fenolických látek v semenáčcích obou testovaných odrůd se při chladovém stresu snížil. Kromě toho aplikací hydrolyzátu došlo k potlačení

hladiny reaktivních forem kyslíku (jako je  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ ) a peroxidace lipidů (jako např. malondialdehyd), jejichž obsah se zvýšil samotným chladem.

Studie ukázala, že působení kombinace hydrolyzát + chlad významně zlepšilo inhibici stejných parametrů vyvolaných chladem ve srovnání se samotným chladem. Zlepšení způsobená využitím bílkovinného hydrolyzátu se obecně pohybovala mezi 10 % a 25 % u stejných parametrů. Ošetření hydrolyzát + chlad zvýšilo čerstvou hmotnost semenáčků o 25 % u Altindane a o 13 % u Bezostaya.

Na závěr své studie Gezgincioğlu a Atici (2023) navrhují, aby bílkovinný hydrolyzát získaný z odpadního kuřecího peří byl využit nejen jako podpora růstu a vývoje pšenice za normálních podmínek, ale také se užíval pro zlepšení její tolerance vůči nízkoteplotnímu stresu.

V rámci výzkumu Małgorzaty Popko a kolektivu (2015) byl testován produkt vyrobený na bázi drůbežího peří jako prostředek k podpoře klíčení řepky (*Brassica napus* L. var. *napus*). Odpadní peří bylo zpracováno pomocí kyselé hydrolýzy. Experimenty prokázaly, že aplikace proteinového hydrolyzátu měla významný vliv na zvýšení biomasy rostlin. Obsah dusíku v rostlinách se zvýšil o 76,2 %, fosforu o 5,20 %, draslíku o 37,3 % a hořčíku o 29,6 % ve srovnání se složením rostlin v kontrolní skupině. Použití rovněž významně ovlivnilo obsah manganu a zinku v testovaných rostlinách. Zlepšená účinnost byla spojena s přítomností aminokyselin získaných prostřednictvím hydrolýzy (Popko et al., 2015).

### 3 FYTOREMEDIACE

Fytoremediace je biologickou metodou remediace, která využívá schopnost zelených rostlin nebo rostlin spolu s mikroorganismy k rozkladu, fixaci a adsorpci různých druhů kontaminantů nebo k jejich transformaci na méně toxické sloučeniny či deriváty (Vaněk et al., 2017). Nejčastěji sanovanou matricí je půda, avšak je možné využít tuto metodu také při sanaci sedimentů, kalů, vzduchu a vody. Ve srovnání s konvenčními fyzikálně-chemickými metodami odstraňování polutantů ze životního prostředí fytoremediace je levnější, dostupnější, neinvazivní, efektivnější a veřejností lépe akceptovatelnou alternativou. Může se využít jako doplňková technologie k jiným technickým sanačním metodám. Jedná se o pomalejší, ale trvalejší proces, může poskytnout dlouhodobé řešení pro kontaminované lokality. K výhodám použití této metody patří nízké náklady na realizaci (rostliny nevyžadují pokročilé technologie, zařízení nebo chemikálie) a energetická nenáročnost (využívají se přirozené procesy fotosyntézy a metabolismu rostlin).

Těžké kovy jsou anorganického původu a z hlediska ochrany životního prostředí jsou charakterizované jako kovy s toxickým účinkem na organismy (toxické kovy). Kvůli intenzivnímu a nadměrnému používání fosfátových hnojiv, čistírenských kalů, komunálního kompostu a důlních odpadů spolu s nedostatečnou kontrolou průmyslového rozvoje došlo k hromadění těžkých kovů v půdě. Těžké kovy mohou zůstat v půdě po mnoho let a představují potenciální riziko fytotoxicity a kontaminace potravního řetězce (Halim et al., 2003). Celosvětově jsou těžkými kovy znečištěny rozsáhlé oblasti zemského povrchu a jsou považovány za jedny z nejvýznamnějších znečišťujících látek (Bartucca et al., 2022). Jen zřídka dochází ke kontaminaci jedním těžkým kovem, zpravidla se ve znečištěných půdách vyskytují současně dva nebo více těžkých kovů.

V této souvislosti se pozornost výzkumníků zaměřuje na vývoj technologických postupů pro odstranění kontaminantu pomocí rostlin. Prostřednictvím kořenů rostliny absorbují kovy, poté dochází k transportu do nadzemních částí rostlin, jako jsou stonky a listy, kde jsou kovy akumulovány. Následně jsou tyto rostliny sklizeny a odstraněny, čímž se z půdy odstraní část kovů. Po odstranění rostlin může být půda opět osázena novými rostlinami. Cyklus fytoremediace se opakuje, dokud se nedosáhne požadované úrovně koncentrace kovů v půdě (Soudek et al., 2008).

### 3.1 Fytoremediační technologie

V závislosti na typu znečišťující látky a specifických potřebách kontaminovaného prostředí se fytoremediace rozděluje do několika fytoremediačních technik.

#### Fytoextrakce

Pojmem fytoextrakce se označuje způsob pro odstraňování anorganických kontaminantů ze znečištěných míst kořeny a jejich „přenášení“ do nadzemních tkání rostlin. To je metoda, při které rostliny akumulují kontaminant, poté jsou sklizeny a zpracovány termicky, chemicky nebo mikrobiálně. Nejčastěji se pomocí fytoextrakce odstraňují kovy, ale taktéž lze odstraňovat metaloidy, radionuklidy a nekovy. Pro využití této metody jsou ideální rostliny, které jsou schopny tolerovat vysoké koncentrace kovů a akumulovat je ve velkém množství v nadzemních částech. Obvykle takové rostliny mají rozvinutý kořenový systém, rostou rychle a produkují velké množství biomasy, což zvyšuje jejich schopnost odstranit kontaminanty a urychlit proces fytoremediace.

Existují přirozeně se vyskytující druhy rostlin, nazvané hyperakumulátory, které obvykle odpovídají všem těmto charakteristikám (Vaněk et al., 2017). Jsou to „cenné“ rostliny, poněvadž dokážou ve svých tkáních akumulovat násobně vyšší koncentraci než většina jiných rostlin a tím odstranit větší množství kontaminantů. Nevýhodou většiny hyperakumulátorů je jejich pomalý růst a relativně nízká produkce biomasy.

V poslední době je velký zájem o techniku, která se nazývá fytomining. Po sklizení a provedení kyselé digesce rostlinné biomasy lze získat soli kovu nebo kov k opětovnému využití, což může být ekonomicky velice výhodné pro vzácné nebo technologicky cenné kovy (Bartucca et al., 2022).

V případě některých typů kovů, které patří do kategorie esenciálních, je možnost využívat sklizenou biomasu s naakumulovaným prvkem k zelenému hnojení a takovým způsobem přenášet a doplňovat některé chybějící prvky v půdách (Quarshie et al., 2021). Například konopí seté (*Cannabis sativa*) pěstované na půdě s vysokým obsahem Se akumuluje v semenech sloučeniny metyl-selenocystein a selenometionin, které představují významné zdroje selenu v potravě. Biomasa konopí setého (*Cannabis sativa*) obohacená o selen by mohla být efektivně využita jako hnojivo pro následné pěstování dalších plodin.

Za předpokladu, že ostatní škodlivé látky nepřesahují přijatelné limity, použitím půd kontaminovaných Fe, Se a Zn může být dosaženo zvýšení obsahu nutričně důležitých látek čili biofortifikace jedlých plodin nebo píce (Roxana et al., 2020).

### **Fytostabilizace**

Pomocí fytostabilizace se snižuje pohyblivost těžkých kovů, což přispívá k poklesu množství půdních erozí, výskytu prachu unášeného větrem a omezení biologické dostupnosti kontaminantů pro potravní řetězec.

### **Fytovolatilizace**

Tato technologie je založena na schopnosti některých druhů rostlin pomocí kořenového systému získávat kovy z půdy, přeměňovat je na těkavé formy a vypařovat z listů. Prostřednictvím této metody je ze znečištěných ploch možné odstranit rtuť (Hg), arsen (As), selen (Se) nebo těkavé organické látky (VOC) (Bartucca et al., 2022).

### **Fytodegradace**

Fytodegradace je proces, při kterém rostliny a související bakteriální a houbové mikroorganismy mohou usnadnit společnou přeměnu kontaminantů na látky neškodící životnímu prostředí (Vaněk et al., 2017).

Tímto termínem se také označuje proces vylučování enzymů kořenovým systémem rostlin, při kterém však existuje riziko přeměny kontaminantu na látky toxické (Soudek et al., 2008).

Obvykle se fytodegradace uplatňuje při dekontaminaci půdy, kalů, sedimentů, podzemní i povrchové vody pro odstraňování organických polutantů, jako jsou herbicidy, insekticidy, výbušniny či chlorovaná rozpouštědla.

### **Rhizodegradace**

Rhizodegradace je metoda, při které je v kořenovém systému rostlin (v rhizosféře) přítomno zvýšené množství mikroorganismů, které se podílí na degradaci organických kontaminantů.

## **3.2 Chelatační činidla**

Velké environmentální riziko pro rostliny představuje kontaminace půdy těžkými kovy. Potenciálním a efektivním řešením sanace kontaminovaných půd je použití fytořemediace. Vzhledem k tomu, že některé kontaminanty mají v půdě omezenou biologickou dostupnost, základním zadáním pro úspěch fytořemediace je nalezení způsobu, jak solubilizovat a uvolnit kovy z půdy a následně tak usnadnit transport kontaminantu do výhonků rostlin.

Za účelem zlepšení akumulční schopnosti a urychlení příjmu kovů u nehyperakumulujících rostlin byl navržen přídavek chelatačních činidel (chelátů). Jejich aplikace do půdy přispívá ke zlepšení schopnosti rostlin akumulovat kovy a tímto otevírá nové možnosti fytoremediace (Evangelou et al., 2007).

V půdním prostředí při aplikaci chelátu dojde nejprve k tvorbě komplexu rozpustných kovů v půdním roztoku. Jak klesá aktivita volných kovů, začínají se rozpouštět vázané ionty kovů, aby vyrovnaly posun v rovnováze. Tento proces pokračuje, dokud není chelát nasycen, případně dokud není vyčerpán přísun kovů z pevných fází a/nebo není dosažena rovnováha a nerozpustnost pevné fáze neomezuje aktivitu volného kovu (Blaylock et al., 1997).

Studie Blaylock a kol. (1997) ukázala, že tohoto cíle lze dosáhnout pomocí syntetických chelátů. V jejich práci byla použita brukev sítinovitá (*Brassica juncea*) k ukázce schopnosti akumulace vysokých koncentrací Pb. I když tato rostlina má genetický potenciál akumulovat Pb a Cd, nedokáže efektivně odstraňovat tyto kovy z půdy, pokud nejsou solubilizovány přidáním vhodné pomocné látky, která napomáhá převedení kovů do roztoku.

V poslední době se při různých fytoextrakčních pokusech často využívají perzistentní aminopolykarboxylové kyseliny (APCA), jako je například kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA). Jako alternativy k syntetickým chelátům byly navrženy biologicky odbouratelné APCA, jako je ethylendiamindisukcinát (EDDS) a kyselina nitrilotrioctová (NTA). Rovněž bylo provedeno několik pokusů s využitím nízkomolekulárních organických kyselin (LMWOA) (Evangelou et al., 2007).

### **Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)**

Díky své schopnosti rozpouštět některé těžké kovy v zemědělských půdách je EDTA pravděpodobně jedním z nejúčinnějších syntetických chelátorů a hraje klíčovou roli ve fytoremediaci. Tato látka váže toxické polutanty v půdě a zároveň slouží jako ochranný mechanismus rostlin před abiotickými a biotickými stresy. (Quarshie et al., 2021).

Výzkum Blaylock a kol. (1997) naznačuje, že brukev sítinovitá (*Brassica juncea*) je schopná akumulovat taky Cd, Cu, Ni a Zn z kontaminované půdy, která byla obohacena EDTA a dalšími syntetickými cheláty. Autoři ve své práci potvrdili, že akumulaci kovů ve výhoncích rostlin lze zvýšit aplikací CDTA (kyselina cyklohexan diaminoethan tetra-octová), DTPA (diethylentriaminpentaoctová kyselina), EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), EGTA (kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová) do půdy.



Liu a kol. (2009) ve svých pracích tvrdí, že *Althaea rosea* Cav. má vysokou toleranci a schopnost akumulace kadmia (Cd). Proto se ve své studii zaměřili na studium vlivu EDTA, dodecylsulfátu sodného (SDS) a kyseliny ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctové (EGTA) na fytořediční schopnost tohoto druhu vůči Cd.

EGTA a SDS se ukázaly jako účinné při zvyšování fytoředičace pomocí *Althaea rosea* Cav. v půdách kontaminovaných Cd. Při aplikaci EGTA a SDS nejenže se zlepšila suchá hmotnost rostlin, ale také se podpořila akumulace Cd ve výhonech a kořenech, zatímco EDTA prokázala toxicitu pro tento druh, což vedlo ke snížení růstu rostlin, i když do jisté míry podporovala akumulaci Cd ve výhonech a kořenech rostlin.

Studie Muhammed a kol. (2009) zdůrazňuje, že EDTA účinně rozpouští Pb, Cr, Cu a Cd v půdě, což vede k jejich extrakci a akumulaci v rostlině *Typha angustifolia* L.

Použití EDTA při fytoextrakci však nemusí být vhodné vzhledem k její vysoké perzistenci v životním prostředí, což může vést ke kontaminaci podzemních vod (Meers et al., 2005). EDTA je navíc drahá a vyšší dávky této látky mohou snížit biomasu a růst rostlin. Přestože EDTA může být účinným nástrojem při fytoextrakci těžkých kovů, má špatnou biologickou odbouratelnost, což může přispět k dlouhodobému sekundárnímu znečištění životního prostředí. Je proto zapotřebí pečlivě zvážit její dávkování a dopady na rostliny a půdní prostředí, aby se minimalizovaly negativní účinky na rostlinný růst, biodiverzitu a půdní ekosystémy (Quarshie et al., 2021).

### **Ethylendiamindisukcinát (EDDS)**

EDDS je biologicky odbouratelné chelatační činidlo, které je přirozeně produkováno řadou mikroorganismů. Bylo provedeno několik studií s přidavkem EDDS, který se ukázal jako účinný při zvyšování příjmu několika kovů (Evangelou et al., 2007).

Ve studii Meerse a kol. (2005) byl popsán výzkum aplikace kovů a chelátu na slunečnice roční (*Helianthus annuus*). Příjem Ni, Cu a Zn byl zvýšen přidavkem EDDS více než přidavkem EDTA, zatímco Cd a Pb byly výrazněji mobilizovány EDTA než EDDS.

Kos a Leštan (2004) zkoumali vliv přidavku různých chelátorů na fytoextrakci mědi (Cu) z půdy. Jako modelovou rostlinu pro fytoextrakční experimenty bylo zvoleno *Brassica rapa* var. *pekinensis*. Nejúčinnější bylo ošetření s chelátorem EDDS, koncentrace mědi v rostlinách se zvýšila 3,3krát ve srovnání s kontrolním ošetřením.

### **Kyselina nitrilotrioctová (NTA)**

NTA je biologicky odbouratelné chelatační činidlo, které se používá především v detergentech. Navzdory jeho očekávaným pozitivním vlastnostem bylo provedeno jen málo studií zaměřených na fytoextrakci kovů za přítomnosti NTA.

Výzkum Meerse a kol. (2005) ukázal, že NTA nezvýšil významně příjem Zn, Cu nebo Cd ve srovnání s kontrolou u slunečnice roční (*Helianthus annuus*). Avšak v případě Ni se příjem zvýšil 2,5krát. Autoři také uvádějí, že degradace NTA probíhá rychle, a to již do 2 týdnů od aplikace, což může být z dlouhodobého hlediska nevýhodné.

Ve svých fytoextrakčních experimentech Quartacci a kol. (2005) použili brukev sítinovitou (*Brassica juncea*) pro extrahovatelnost Cd z půdy, NTA byla přidána jako chelatační činidlo. V porovnání s neošetřenými vzorky se po přidání 10 a 20 mmol kg<sup>-1</sup> NTA koncentrace kadmia (Cd) ve výhonech zvýšila 2krát, resp. 3,3krát.

### **Nízkomolekulární organické kyseliny (LMWOA)**

Uvolňování organických sloučenin kořeny může ovlivňovat rozpustnost esenciálních a toxických iontů jak nepřímo, tak přímo. Nepřímo prostřednictvím jejich vlivu na mikrobiální aktivitu, dynamiku růstu kořenů, přímo prostřednictvím chelatace, acidifikace, precipitace a oxidačně-redukčních reakcí v rhizosféře. Když jsou rostliny vystaveny stresu z nedostatku Fe, nízké koncentrace Ca a P, zvyšuje se jejich uvolňování.

Významnými jsou kyselina citronová, kyselina jablečná a kyselina šťavelová, které díky svým komplexotvorným vlastnostem hrají významnou roli při rozpouštění těžkých kovů, ale u jednotlivých druhů rostlin se značně liší vliv jejich přidavku na příjem těžkých kovů (Evangelou et al., 2007).

Níže popsaná studie naznačuje, že použití přírodních organických kyselin může být efektivní alternativou k syntetickým chelátorům.

Evangelou a kol. (2006) v rámci svého výzkumu jako alternativy k syntetickým chelátorům použili tři přírodní nízkomolekulární organické kyseliny (kyselinu citronovou, šťavelovou a vinnou). Tyto kyseliny byly použity k ovlivnění příjmu Cu a Pb v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum*). Výsledky ukázaly, že přidavek kyseliny citronové vedl ke dvojnásobnému zvýšení příjmu mědi, přidavek kyseliny šťavelové vedl k 0,5násobnému zvýšení, zatímco přidavek kyseliny vinné nezpůsobil žádné zvýšení. Nicméně ve stejném pokusu se ukázalo, že přidavek nízkomolekulárních organických kyselin neměl žádný vliv

na příjem olova. Možné vysvětlení nedostatku účinku aplikace na fytoextrakci olova může spočívat v rychlosti degradace těchto kyselin. Je možné, že tyto organické kyseliny se příliš rychle rozkládají v půdě, což by mohlo způsobit nedostatek času pro interakci s těžkými kovy, jako je olovo, které mají nízkou mobilitu a biologickou dostupnost.

Ve studii Quartacci a kol. (2005) použili kyselinu citronovou a NTA jako chelatační činidla pro příjem a akumulaci Cd v brukvi sítinovité (*Brassica juncea*). Po přidání NTA a kyseliny citronové se koncentrace Cd ve výhoncích zvyšovala s úrovní Cd v půdě. V porovnání s kontrolou při aplikaci kyseliny citronové se koncentrace Cd ve výhoncích nezměnila, zatímco u rostlin ošetřených NTA došlo k přibližně dvojnásobnému zvýšení.

### 3.3 Alternativní chelatační činidla

Ačkoliv se fytoextrakce ukázala jako perspektivní metoda pro odstranění těžkých kovů z kontaminovaných půd, má svá omezení. Rostliny vyžadují čas na absorpci kovů a jsou omezeny svou schopností přijímat tyto látky. Použití syntetických chelátorů, jako např. EDTA, sice zvyšuje efektivitu extrakce, ale může mít vedlejší negativní účinky v podobě fytotoxicity, snížení biomasy výhonků a zvýšeného vyluhování esenciálních kovů (Evangelou et al., 2008). Např. u chelatačních činidel, jako jsou EDDS a NTA, stále přetrvávají obavy ohledně jejich toxicity pro rostliny (chloróza a nekróza) a negativního vlivu na vyluhování kovů do okolního prostředí (Meers et al., 2005).

Jako náhradní řešení použití tradičních chelatačních činidel je možné zkoumat využití jiných látek k mobilizaci těžkých kovů, které by mohly být perspektivními alternativami.

Evangelou a kol. (2008) zkoumali vliv enzymaticky hydrolyzované vlny na biologickou dostupnost těžkých kovů a potenciál jejího využití k zvýšení fytoextrakce Cu a Cd z půdy pomocí tabáku (*Nicotiana tabacum*). Bylo pozorováno významné zvýšení příjmu mědi a kadmia, a to až o 850 %, resp. 30 % v závislosti na dávce použité hydrolyzované vlny. Autoři uvádí vykázání pouze minimální pravděpodobnosti vyluhování kovů při aplikaci hydrolyzované vlny, což je často pozorováno při aplikaci chelatačních činidel, jako je EDTA nebo EDDS. Z toho může být vyvozen závěr, že hydrolyzovaná vlna může být mimořádně účinným nástrojem pro zvýšení efektivitu fytoextrakce. Je však třeba zdůraznit, že přidání hydrolyzované vlny by mohlo způsobit vyluhování kovů, zejména pokud by byla aplikována krátce před intenzivními dešti.

Solcova a kol. (2023) testovali jako nové ekologické chelatační činidlo pro odstraňování těžkých kovů z průmyslových půd hydrolyzát, který byl připraven tepelnou tlakovou hydrolyzou odpadního kuřecího peří iniciovanou kyselinou jablečnou, což vedlo k výrobě "zeleného hydrolyzátu" bez přítomnosti anorganických solí. Také prováděli porovnání účinnosti výsledného hydrolyzátu s EDTA při odstraňování těžkých kovů z průmyslových půd kontaminovaných starými zátěžemi. Mezi hydrolyzátem z kuřecího peří a EDTA nebyl velký rozdíl v jejich účinnosti. Prakticky zcela oba odstranily As, ale pro Cr a Ni lepší účinnost extrakce v průběhu 24 hodin byla pozorována u hydrolyzátu.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Přístroje a laboratorní pomůcky

- Analytické váhy Kern ABJ 220 - 4NM, Německo,
- Míchačka magnetická IKA Color Squid, Laboratory equipment, Německo,
- Termostat ( $25 \pm 1$  °C),
- Horkovzdušná trouba, Mora, Česká republika,
- Sušárna UM 100, Memmert, Německo
- pH metr 720 WTW series InoLab – kombinovaná pH elektroda: pH elektroda SenTix 41, WTW, rozsah pH 0-14 /0-80 °C/ store in 3 mol/l KCl, Německo
- Spektrofotometr Thermo Scientific Spectrometer Helios Epsilon (USA) ( $\lambda_{\max} = 519$  nm, optická délka kyvety 1 cm)
- Mineralizátor MLS 1200, digestion/drying module, exhaust module EM-30, Milestone – microwave laboratory systems, Švýcarsko,
- Atomový absorpční spektrometr ContraAA 800, Analytik Jena AG, Jena, Německo,
- Míchadlo RZR 2020, Heidolph, Německo,
- Infračervený spektrometr Thermo scientific Nikolet iS10 FTIR spektrometr (Thermo Fisher Scientific Inc., USA),
- Lampa (Pěstírna bylinek), s LED osvětlením, Tescoma s.r.o., U Tescomy 241, Zlín, Česká republika
- Plastové Petriho misky o průměru 9 cm,
- Filtrační papír (grade 1288, plošná hmotnost papíru  $80 \text{ g/m}^2$ , záchyt částic - nad  $15 \text{ }\mu\text{m}$ ), P-LAB,
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky.

### 4.2 Použité chemikálie

- Aceton ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ), čistota p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česko
- Chlornan sodný 11-15 % ( $\text{NaOCl}$ ,  $M_r = 74,44 \text{ g/mol}$ ), Thermo Scientific Chemicals

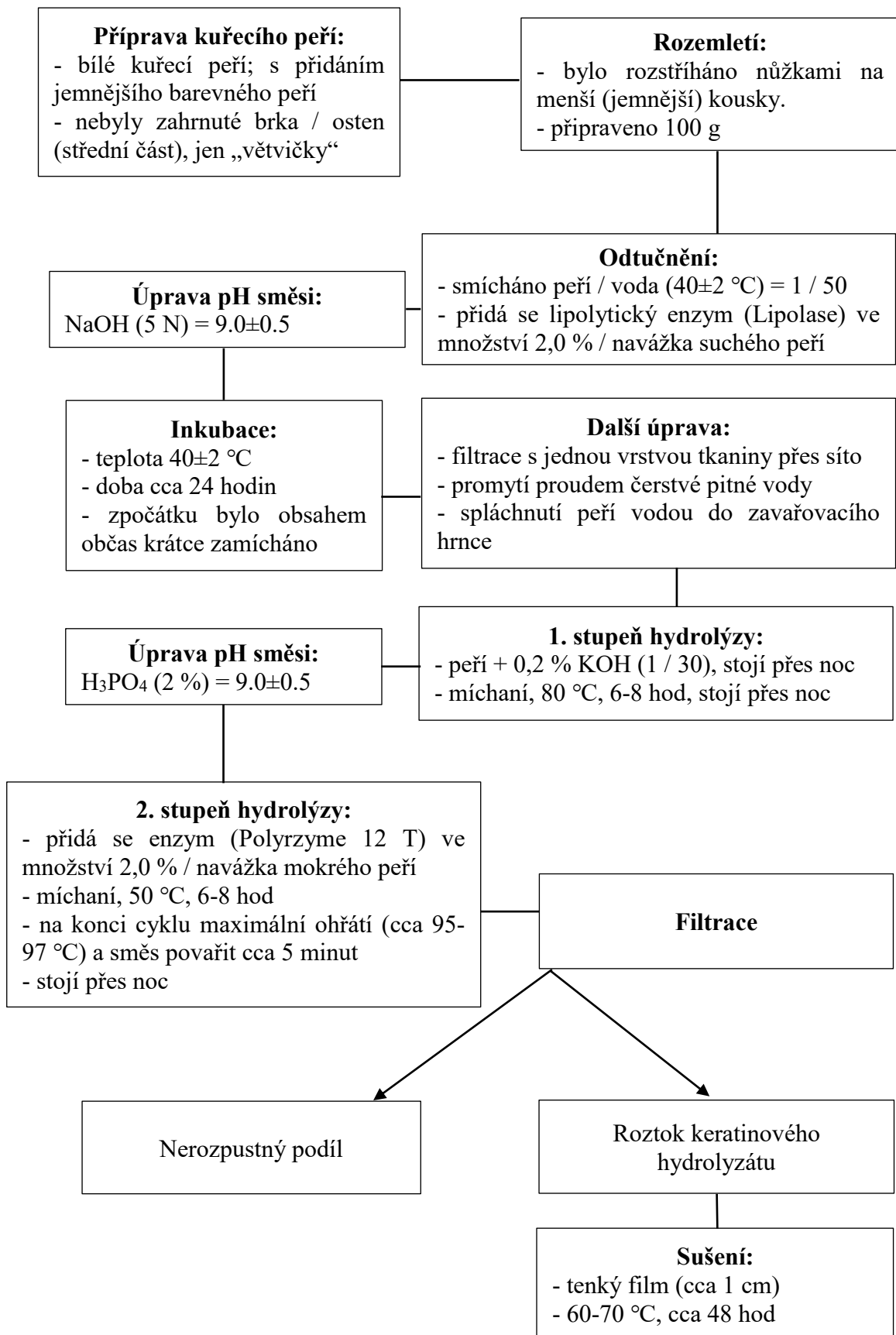
- Kyselina chlorovodíková 35 % (HCl, Mr = 36,46 g/mol), čistota p.a., Penta s.r.o.
- Hydroxid sodný (NaOH, Mr = 40 g/mol), čistota p.a., Penta s.r.o.
- Kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA), čistota p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česko
- Peroxid vodíku pro ultrastopovou analýzu 30 % (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), analpure – ultra, Analytika, spol. s r.o.
- Kyselina dusičná (HNO<sub>3</sub>) 65–69 % analpure-ultra, Analytika, spol. s.r.o.
- enzym Lipolase 100L, Biotech, spol s.r.o. a enzym Polyrzyme 12 T byl laskavě poskytnut prof. Ing. Pavlem Mokrejšem, Ph.D.

#### **Testované těžké kovy**

- As – arsenitan sodný (NaAsO<sub>2</sub>, Mr = 129,91 g/mol), čistota p.a., Penta s.r.o.
- Cd – chlorid kademnatý (CdCl<sub>2</sub>, Mr = 183,32 g/mol), čistota p.a., Penta s.r.o.

#### **4.3 Testovaná látka**

Jako zkoušená látka v rámci této diplomové práce byl využit keratinový bílkovinný hydrolyzát, který byl laboratorně vyroben enzymatickou hydrolyzou z kuřecího peří dle postupu (Mokrejs et al., 2011) schematicky znázorněného na Obr. 2.



Obrázek 2 Schéma zpracování kuřecího peří na keratinový hydrolyzáte



## 4.4 Rostlinný materiál

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*), odrůda: krmná ozimní, nebyl chemicky ošetřen; jetel inkarnát (*Trifolium incarnatum*); vikev (*Vicia*), pšenice (*Triticum*); technické konopí seté (*Cannabis sativa*). Osiva všech rostlin byly laskavě poskytnuty D. Šašinkovou ze Z. S. Pitín, a.s. (ekologické zemědělství).

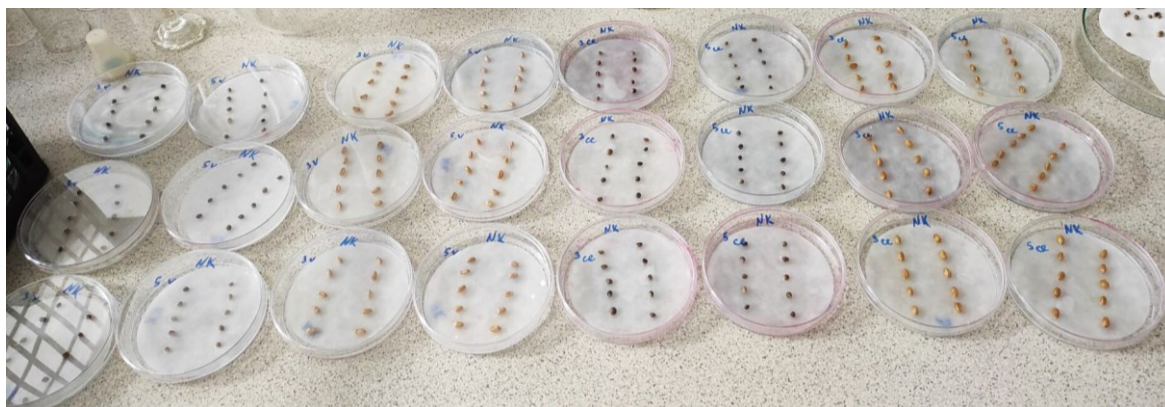
### 4.4.1 Test klíčivosti

Obecně je princip testu založen na umístění semen do speciálních podmínek, jako jsou konstantní teplota a absence světla, a sledování, kolik semen začne klíčit a jak rychle. Postupováno bylo podle následujícího postupu:

Filtrační papíry byly 3x promyty vařící destilovanou vodou pro odstranění nežádoucích látek, následně vysušeny v horkovzdušné troubě. Připravené filtrační papíry byly umístěny na plastové Petriho misky o průměru 9 cm.

Bylo aplikováno dezinfekční činidlo NaOCl 1 % na semena rostlin. Semena se nacházela v 1 % roztoku NaOCl po dobu 15 min, poté byla opláchnuta demineralizovanou vodou. Takto připravená semena byla rovnoměrně rozložena na Petriho misky (n = 10). Bylo přidáno 5 ml demineralizované vody na jednotlivé vzorky. Následně Petriho misky se semeny byly uloženy do termostatu s konstantní teplotou  $25 \pm 1$  °C na dobu 7 dnů, klíčení za temna.

Pro každý experiment byl test proveden v triplicátech po 10 semenech.



Obrázek 3 Fotografie – screeningový test klíčivosti na Petriho miskách rostlin technické konopí seté (*Cannabis sativa*) a ječmen setý (*Hordeum vulgare*), část připravených vzorků, (foto Licinar, 2024)

#### 4.4.2 Vliv keratinového hydrolyzátu na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Byl použit optimalizovaný postup, při kterém klíčivost byla testována v Petriho miskách. Zkoušená látka spolu se semeny za řízených podmínek po dobu 7 dnů byla testována na Petriho miskách. Při testu semena byla ve fyzickém kontaktu se zkoušenou látkou. Všechny pokusy byly provedeny 3x paralelně vedle sebe. Klíčení rostlin a růst kořenů se měřil a porovnával s kontrolním vzorkem.

Postup práce:

Semena ječmenu setého (*Hordeum vulgare*) byla dezinfikovaná jednocentním NaOCl po dobu 15 minut, poté byla opláchnuta 3x demineralizovanou vodou.

Dále byly připraveny pracovní roztoky keratinového hydrolyzátu o koncentraci (bylo přepočítáno na aktuální navážku):

25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l, 400 mg/l, 500 mg/l.

Pracovní roztok keratinového hydrolyzátu byl míchán na magnetické míchačce po dobu 10 minut pro dokonalé rozpuštění látek v roztoku. Roztok keratinového hydrolyzátu byl vždy čerstvě připraven v den aplikace.

Filtrační papír, který byl předem 3x promyt vařící destilovanou vodou a vysušen v horkovzdušné troubě, byl položen na dno Petriho misky o průměru 90 mm, poté bylo rovnoměrně rozmístěno na filtračním papíru 10 semen ječmenu setého (*Hordeum vulgare*). Potom byl aplikován testovaný roztok keratinového hydrolyzátu o objemu 5 ml jednotlivě z každé koncentrace (25 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l, 400 mg/l, 500 mg/l) v triplikátech.

Při přípravě kontrolního vzorku byla použita pouze demineralizovaná voda bez přidaného hydrolyzátu. Vzorek byl připraven s 5 ml vody, také ve třech replikách.

Takto připravené Petriho misky se semeny rostlin byly umístěny do termostatu udržujícího konstantní teplotu  $25 \pm 1$  °C po dobu 7 dnů. Semena byla vystavena testovanému materiálu za řízených podmínek a klíčila ve tmě.

Po sedmi dnech bylo provedeno měření rostlin a byly vyhodnoceny parametry jako klíčivost, délka klíčku, délka kořene a hmotnost suché biomasy.

#### 4.4.3 Test vlivu těžkých kovů (Cd, As) na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Semena ječmene setého (*Hordeum vulgare*) byla dezinfikována jednocentním roztokem NaOCl po dobu 15 minut. Poté byla opláchnuta demineralizovanou vodou.

Ze zásobních roztoků (arsenu/kadmia) o koncentraci 1000 mg/l byly připraveny pracovní roztoky kovů (arsenu/kadmia) o koncentraci:

5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l; 12,5 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l.

Roztoky kovů byly neutralizovány pomocí HCl případně NaOH na pH v rozmezí 7 až 7,9.

Dále byla připravena sada roztoků těžkých kovů spolu s hydrolyzátem. Byla vyzkoušena aplikace hydrolyzátu o koncentraci 400 mg/l (viz Tab. 2).

Tabulka 2 Příprava roztoků těžkých kovů v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem

c (As/Cd), mg/l	c (Hydr.), mg/l
5	400
10	
20	

Pracovní roztok keratinového hydrolyzátu byl míchán na magnetické míchače po dobu 10 minut pro dokonalé rozpuštění látek v roztoku.

Do Petriho misek byl položen filtrační papír. Do každé misky bylo rozloženo 10 předem připravených semen a rovnoměrně zvlhčeno 5 ml jednoho z připravených roztoků.

Všechny vzorky byly připraveny ve třech replikách.

Kontrolní vzorek byl připraven bez přidání těžkých kovů a hydrolyzátu, byla použita pouze demineralizovaná voda (5 ml vody, ve třech replikách).

Petriho misky se semeny byly umístěny do termostatu s teplotou  $25 \pm 1$  °C po dobu 7 dnů, klíčení ve tmě.

#### 4.4.4 Stanovení těžkých kovů atomovou absorpční spektrometrií (AAS) v suché biomase ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Metoda atomové absorpční spektrometrie se využívá k stanovení obsahu stopových i významných koncentrací jednotlivých prvků v analyzovaném roztoku. Metodou lze stanovit přes 60 prvků periodické tabulky s citlivostí od tisícín do stovek mg/l. V rámci této práce byly využity plamenové (stanovení Cd) nebo elektrotermické, tzv. grafitová pec (stanovení As) metody atomizace.

##### Mineralizace vzorku

Pro přípravu vzorků rostlin byly celé rostliny ponořeny do ledově chladné EDTA na dobu 5 minut pro odstranění kovů z povrchu, potom důkladně třikrát opláchnuty demineralizovanou vodou, aby se odstranily případné nečistoty a zbytky. Poté byly rostliny vysušeny v sušárně při teplotě 70 °C do konstantní hmotnosti.

Pro mineralizaci sušená biomasa byla nejprve navážena v rozmezí 0,1 až 0,3 g (s přesností na pět desetinných míst) do předem zvažovaných mineralizačních kelímků. K těmto vzorkům bylo přidáno 2,5 ml 67 % kyseliny dusičné a 0,5 ml 30 % peroxidu vodíku.

Slepý pokus, který neobsahuje žádný vzorek rostlin, byl připraven z 2,5 ml 67 % kyseliny dusičné a 0,5 ml 30 % peroxidu vodíku.

Jako kontrola, pro kontrolu přesnosti a spolehlivosti analýzy pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS), byl rozkládán i certifikovaný referenční materiál QCM – zelená řasa (Metranal 8, Analytika) s certifikovaným obsahem Cd ( $0,023 \pm 0,004 \mu\text{g/g}$ ) a As ( $41 \pm 3 \mu\text{g/g}$ ).

Připravené vzorky a certifikovaný referenční materiál QCM – zelená řasa (Metranal 8, Analytika) byly následně umístěny do mikrovlnného rozkladného systému a program byl spuštěn po dobu 20 minut (parametry programu viz Tab. 3).

Tabulka 3 Mineralizační program

Krok	Čas [min]	Výkon [W]
1.	2	250
2.	2	0
3.	5	400
4.	2	0
5.	2	500
6.	2	0
7.	6	600

Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl obsah mineralizačních kelímků opatrně kvantitativně převeden do 25 ml odměrných baněk a doplněn po rysku demineralizovanou vodou.

Po převedení mineralizačního roztoku vzorků byly prázdné mineralizační kelímky několikrát promyty demineralizovanou vodou a po napipetování 3 ml 67 % kyseliny dusičné byl proveden kompletní proces mineralizace (čistící krok).

#### **Stanovení obsahu kadmia pomocí AAS s plamenovou atomizací**

Pro analýzu vybraného prvku byla nejprve provedena optimalizace. Pro Cd (vlnová délka = 228 nm) tento proces zahrnoval následující základní parametry:

- výška plamene 4 mm,
- poměr acetylenu k vzduchu 0,078,
- průtok plynu 40 l/h.

Po nastavení všech nezbytných parametrů následovalo samotné měření, během něhož přístroj na základě předem připravených standardních roztoků kadmia o koncentraci 0,0 mg/l, 1,0 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l pomocí softwaru přístroje vypočetl koncentrace daného analytu v měřených vzorcích. Tento proces využívá kvadratickou regresní analýzu k přesnému stanovení koncentrace analytů ve vzorcích.

#### **Stanovení obsahu arsenu pomocí AAS s elektrotermickou atomizací**

Vzorek byl nejprve převeden do kapalné formy a poté byl přístrojem vstříknut na grafitovou pec, ve které byl vzorek vystaven vysokým teplotám, což způsobuje jeho atomizaci. Tento

proces umožňuje vytvoření homogenního plynného proudu vzorku. Pyrolýza probíhala při teplotě 1100 °C a atomizace při 2200 °C.

Pro stanovení koncentrace arsenu ve vzorcích přístrojem byla vytvořena a využita kalibrace pomocí připravených standardních roztoků arsenu o koncentraci: 0 ug/l; 125 ug/l; 250 ug/l; 375 ug/l. Následně pomocí softwaru přístroje vypočítaná koncentrace analytu ve vzorku. Tento proces využívá lineární regresní analýzu.

#### Výpočet koncentrace těžkého kovu v sušině biomasy

Pro přepočítání zjištěné koncentrace těžkého kovu (kadmia, arsenu) v roztoku na gram sušiny byla využita rovnice:

$$c(\text{těž. k}) = \frac{c_a \cdot V_{roz}}{m_n} \quad \frac{mg}{g} \quad (1)$$

$c(\text{těž. k})$  – obsah těžkého kovu v biomase, mg/g

$c_a$  – koncentrace stanoveného analytu vypočítaná z kalibrační křivky, mg/l

$V_{roz}$  – objem roztoku po mineralizaci, l

$m_n$  – hmotnost navážky sušiny biomasy použité k mineralizaci, g

#### 4.4.5 Stanovení chlorofylů spektrofotometricky

Pro stanovení chlorofylů byly využity jen zelené části a rostliny se pěstovaly pod lampou s udržení vlhkosti po dobu 7 dnů, se střídáním pozice misek – fotoperioda 12/12h den/noc.



Obrázek 4 Fotografie – klíčení rostlin ječmenu setého (*Hordeum vulgare*) pod lampou, (foto Licinar, 2024)



Obrázek 5 Fotografie – ukázkové foto vyklíčených rostlin ječmenu setého (*Hordeum vulgare*) pod lampou, (foto Licinar, 2024)

Pro přípravu vzorků zaprvé byly zelené části rostlin opláchnuty demineralizovanou vodou. Poté byly vysušeny v sušárně při teplotě 70 °C do konstantní hmotnosti.

Byla zvážena suchá biomasa ječmene setého (*Hordeum vulgare*) s přesností na pět desetinných míst na analytických vahách. Vzorek byl přenesen do třecí misky. V této misce byly listy rozetřeny s přidavkem 20 ml 80 % acetonu a  $\text{CaCO}_3$  (přibližně 0,1 gramu, což je na špičku lžičky). Tření bylo ukončeno, když v misce již nezůstal žádný pevný zelený materiál a všechny rostliny vzorku byly důkladně rozetřené. Extrakt připravený podle popsaného postupu byl přenesen do malé kádinky a byl ponechán stát v temnu 15 min. Třecí miska byla několikrát omyta malým množstvím 80 % acetonu.

Poté byl extrakt z kádinky zfiltrován přes filtrační papír smočený 80 % acetonem a převeden do malé odměrné baňky s objemem 25 ml. Odměrná baňka byla doplněna 80 % acetonem po rysku.



Obrázek 6 Fotografie – ukázkové foto připravených vzorků rostlin ječmenu setého (*Hordeum vulgare*) pro spektrofotometrické měření, (foto Licinar, 2024)

Vzorky byly proměřeny v kyvetách o optické délce 1 cm na spektrofotometru při vlnových délkách 649 a 665 nm, s referencí na 80 % aceton.

Naměřené hodnoty absorpance jednotlivých vzorků pro vlnové délky 649 nm a 665 nm byly dosazeny do rovnic pro výpočet koncentrace chlorofylů *a*, *b* a celkového podle rovnic (2), (3) a (4):

$$Chl_a = 11,63 \cdot (A_{665}) - 2,39 \cdot (A_{449}) \quad \frac{mg}{l} \quad (2)$$

$$Chl_b = 20,11 \cdot (A_{649}) - 5,18 \cdot (A_{665}) \quad \frac{mg}{l} \quad (3)$$

$$Celkový\ chl = 6,45 \cdot (A_{665}) + 17,72 \cdot (A_{449}) \quad \frac{mg}{l} \quad (4)$$

Výsledek je v jednotkách mg/l, tato data byla přepočtena na množství pigmentů ku hmotnosti rostlin, ve výsledkové části uváděna v jednotkách µg/g.

#### 4.5 Vyhodnocení parametrů

Po uplynutí 7 dnů od založení pokusu byla spočítána nevyklíčená semena a byl zaznamenán a vyhodnocen počet vyklíčených semen. Prvním sledovaným parametrem byla klíčivost semen. Klíčivost semen, která je označená jako *KL*, byla vyjádřena jako procento semen,



kteřá úspěšně vyklíčila v dané sadě za optimálních podmínek po dobu 7 dnů. Výpočet byl prováděn podle následujícího vztahu (5):

**Klíčivost:**

$$KL = \frac{V_1 + V_2 + \dots}{y} \% \quad (5)$$

$KL$  – klíčivost, %

$V$  – počet vzklíčených semen,

$y$  – celkový počet semen v sadě.

Dalšími hodnocenými parametry byly průměrná délka klíčku a kořenu. Tyto údaje jsou důležité při studiu klíčení semen a růstu mladých rostlin, poskytují informace o rychlosti a úspěšnosti klíčení, mohou sloužit jako indikátory vitality rostliny. Jsou to statistické ukazatele, které vyjadřují střední hodnotu délek klíčků, popřípadě kořenu určitého vzorku semenáčků nebo klíčících semen. Délka klíčku se měřila od místa, kde klíček vyrůstá ze semene, po jeho konec. Měření kořenu se provádělo od základny kořene, v místě, kde se spojuje s rostlinným tělem, až po jeho konec. Získané údaje byly vyhodnoceny podle vztahů (6) a (7).

**Délka klíčku:**

$$PDKL = \frac{KL_1 + KL_2 + \dots}{x} \text{ cm} \quad (6)$$

$PDKL$  – celková průměrná délka klíčku, cm

$KL_1$  – průměrná délka klíčku, cm

$x$  – počet replikací (Petriho misek) daného vzorku.

**Délka kořene:**

$$PDKR = \frac{KR_1 + KR_2 + \dots}{x} \text{ cm} \quad (7)$$

$PDKR$  – celková průměrná délka kořene, cm

$KR_1$  – průměrná délka nejdelšího kořene, cm

$x$  – počet replikací (Petriho misek) daného vzorku.

Pro porovnání množství organické hmoty mezi různými vzorky bylo provedeno měření suché biomasy. To je důležité pro studium různých vlivů na růst a vývoj rostlin. Suchá biomasa byla vypočtena podle rovnice (8).

**Suchá biomasa:**

$$DM = \frac{M_1 + M_2 + \dots}{x} \quad g \quad (8)$$

$DM$  – průměrná hmotnost suché biomasy, g

$M_1$  - průměrná hmotnost vzorku, g

$x$  – počet replikací (Petriho misek) daného vzorku

Bylo využíváno stanovení inhibice růstu rostlin k testování látek, které mohou ovlivnit růst rostlin.

**Inhibice růstu:**

$$I = \frac{H_k - H_t}{H_k} \quad \% \quad (9)$$

$I$  – inhibice růstu, %

$H_k$  – průměrná celková hmotnost kontroly, g

$H_t$  – průměrná celková hmotnost při testované koncentraci, g

## 5 VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST

Grafy a tabulky v této kapitole prezentují vyhodnocené výsledky účinku keratinového hydrolyzátu a těžkých kovů na vybrané rostliny. Statistická analýza dat byla provedena a zpracována pomocí programu Excel XP (Microsoft); FTIR spektra byla zpracována pomocí OriginPro 2024 (64-bit) (verze 10.1.0.170 (Learning Edition)).

Data byla prezentována s cílem poskytnout přehled o pozorovaných trendech a rozdílech mezi jednotlivými experimenty. Na základě již publikovaných vědeckých prací ((Redjala et al., (2009), Shedeed, Farahat, (2023)) byla jako kontrola při kultivaci použita demineralizovaná voda.

### 5.1 Kontrola kvality semen a optimalizace postupu kultivace

#### Optimalizace postupu kultivace

Na základě diplomové práce J. Březinové (2020) byl pro optimalizaci postupu kultivace rostlin na Petriho miskách vybrán ječmen setý. Bylo vyzkoušeno pěstování semen bez dezinfekce a s dezinfekcí pro zabránění možnému rozvoji plísní. Jako dezinfekční činidlo na semena rostlin byl zvolen NaOCl (Stingu et al., 2012). Na základě literatury (Stingu et al., 2012) bylo testováno ponoření semen do roztoku NaOCl o koncentracích 1 až 5 % po dobu 5 až 15 min. Z výsledků těchto testů vyplynulo, že ideální je dezinfekce semen v roztoku 1 % NaOCl po dobu 15 min, poté opláchnutí 3x demineralizovanou vodou.

Bylo zvoleno využití 10 semen rostlin pro možnost rovnoměrného rozložení na Petriho misky.

Munzuroglu, Geckil, (2002) ve své práci při setí semen na Petriho misky navlhčovali filtrační papír 9 ml testovaného roztoku a Shedeed, Farahat, (2023) vyzkoušeli denně zavlažování semen 3 ml příslušného roztoku v závislosti na druhu semen a prováděných testech.

V této práci byla vyzkoušena aplikace 3 a 5 ml demineralizované vody na Petriho misku o průměru 9 cm, aby byla zajištěna dostatečná vlhkost po dobu kultivace. Zjistilo se, že dostatečným množstvím pro zvlhčení je 5 ml demineralizované vody.

V pracích (Ibañez et al., (2021), Munzuroglu, Geckil, (2002), Mahmood et al., (2007), Du et al., (2024)) je uváděna doba kultivace semen 3 až 10 dnů dle druhu rostliny a testovaných

látek. Dalším krokem tedy bylo zvolení optimální doby kultivace pro získání dostatečného množství biomasy určené k analýze na AAS a stanovení chlorofylu. Testována byla doba 3 dny, 7 a 10 dnů. Jako optimální se ukázala sedmidenní kultivace, bylo získáno dostatečné množství biomasy pro plánované analýzy a zároveň byla zachována dobrá kvalita kultivovaných rostlin.

### Výběr rostlinných druhů

Za zvolených experimentálních podmínek byla otestována semena všech rostlinných druhů. Nicméně jetel inkarnát (*Trifolium incarnatum*), vikev (*Vicia*), pšenice (*Triticum*) neukázaly příznivou tendenci, klíčivost byla pod 60 % (viz Tab. 4). I přesto, že semena byla fyzicky celá, nepoškozená, nebyla životaschopná, nemohla klíčit a vytvořit novou rostlinu. Existuje několik faktorů, které mohly ovlivnit vitalitu a způsobit špatnou klíčivost námi testovaných semen. Například, jejich stáří, genetická kvalita a podmínky skladování.

Tabulka 4 Stanovení klíčivosti a vitality semen

jednotlivé druhy	klíčivost, %
jetel inkarnát ( <i>Trifolium incarnatum</i> )	46
vikev ( <i>Vicia</i> )	46
pšenice ( <i>Triticum</i> )	56
technické konopí seté ( <i>Cannabis sativa</i> )	66
ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> )	96

Z Tab. 4 je vidět, že přijatelná klíčivost je pouze u technického konopí (66 %) a ječmene setého (96 %).

Rostlina *Cannabis sativa* má fytořediační schopnosti, jak uvádí v své práci Gabriele a kol. (2023). Autoři navrhují využití *Cannabis sativa* pro fytořediaci půdy kontaminované pyrenem (PYR), fenanthrenem (PHE) a mědí (Cu). Experiment Gabriele a kol. probíhal v květináčích po dobu 50 dnů s různými počátečními koncentracemi polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a konstantní koncentrací mědi (Cu). Výsledky studia naznačují, že *Cannabis sativa* vykazuje potenciál redukovat obsah PAH a Cu v půdě, přičemž růst rostlin byl ovlivněn úrovní koncentrace kontaminantů. Nicméně první experimenty realizované v rámci této diplomové práce ukázaly, že již samotný keratinový hydrolyzát neměl pozitivní přínos na klíčivost a růst námi vybrané odrůdy *Cannabis sativa* (data nejsou prezentována). Z tohoto důvodu jsme od použití této rostliny upustili a v rámci

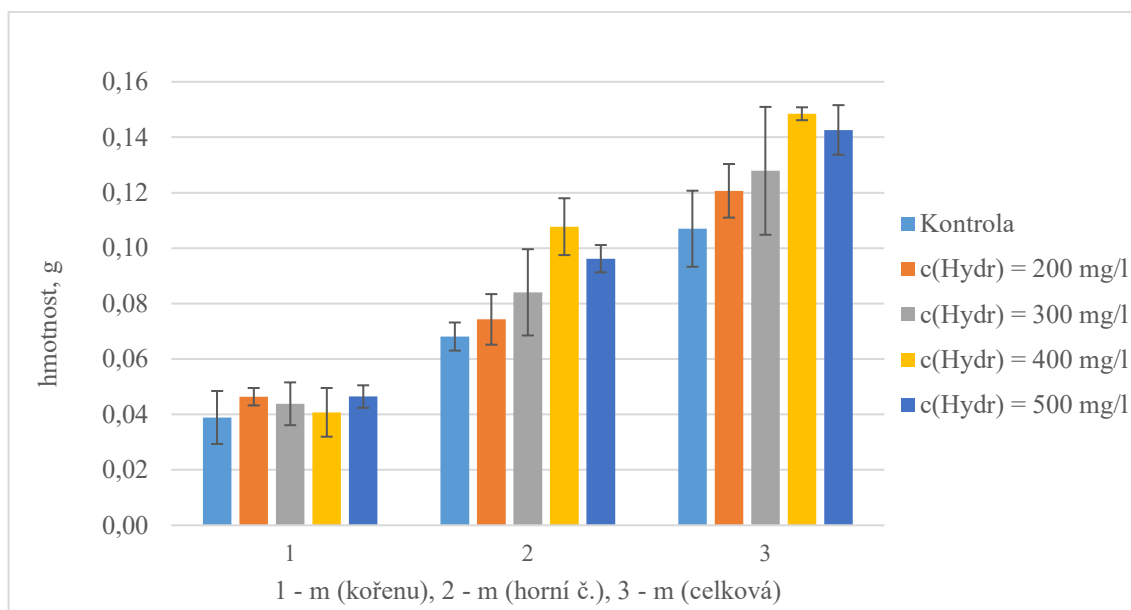
experimentů bylo pracováno pouze s ječmenem setým (*Hordeum vulgare*), u kterého klíčivost dosahuje skoro 100 %.

## **5.2 Vliv keratinového hydrolyzátu na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)**

Cílem tohoto experimentu bylo zkoumání vlivu keratinového hydrolyzátu na klíčivost semen ječmene setého. Během provádění těchto experimentů bylo testováno více různých koncentrací keratinového hydrolyzátu. Tato variace v koncentracích umožnila detailní přehled vlivu keratinového hydrolyzátu na rostliny a identifikaci optimální aplikační koncentrace pro maximální účinek.

Počet vyklíčených semen ječmene setého (*Hordeum vulgare*) z těchto pokusů, spolu s průměrnou klíčivostí, která se pohybovala v rozmezí od 83 % do 93 %, a dalšími biometrickými parametry při aplikaci testovaného hydrolyzátu, jsou uvedeny v Příloze P I.

Morfologie rostlin, které byly vystaveny keratinovému hydrolyzátu, měla některé zřetelné rozdíly ve srovnání s rostlinami v kontrole, které byly kultivovány pouze v demineralizované vodě. V obou případech během klíčení bylo pozorováno pravidelné rozvinutí primárních (embryonálních) kořenů a oddenkové části (horní části). Vizuálně rostliny byly významně silnější s pevnějšími klíčky. U rostlin kultivovaných za přítomnosti keratinového hydrolyzátu byl pozorován více rozvinutý kořenový systém, s počtem kořenů 3 až 6, zatímco u kontrolních rostlin maximální počet kořenu dosáhl – 5.



Obrázek 7 Vliv vybraných koncentrací (200-500 mg/l) keratinového hydrolyzátu na celkovou hmotnost biomasy ječmene setého (*Hordeum vulgare*); n=3, průměr ± směrodatná odchylka

Při porovnání s kontrolou, kde se používala jen demineralizovaná voda bez přítomnosti hydrolyzátu, byl pozorován nárůst biomasy při aplikaci všech čtyř koncentrací keratinového hydrolyzátu.

Z Obrázku 7 je vidět, že nejlepší růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*) byl zaznamenán při aplikaci hydrolyzátu o koncentraci 400 mg/l. Toto zjištění je v souladu s diplomovou prací J. Březinové (2020). Z hlediska tvorby celkové biomasy tato koncentrace rostlinám prospívá nejlépe, poněvadž nárůst biomasy se zvýšil o 39 % ve srovnání s kontrolou. Trochu nižší růst byl pozorován u semen ošetřených keratinovým hydrolyzátem s koncentrací 500 a 300 mg/l, což odpovídá zvýšení nárůstů o 33 % a 20 % oproti kontrole. Z Obr. 7 je také patrné, že keratinový hydrolyzát bude pravděpodobně přispívat k podpoře růstu nadzemní části.

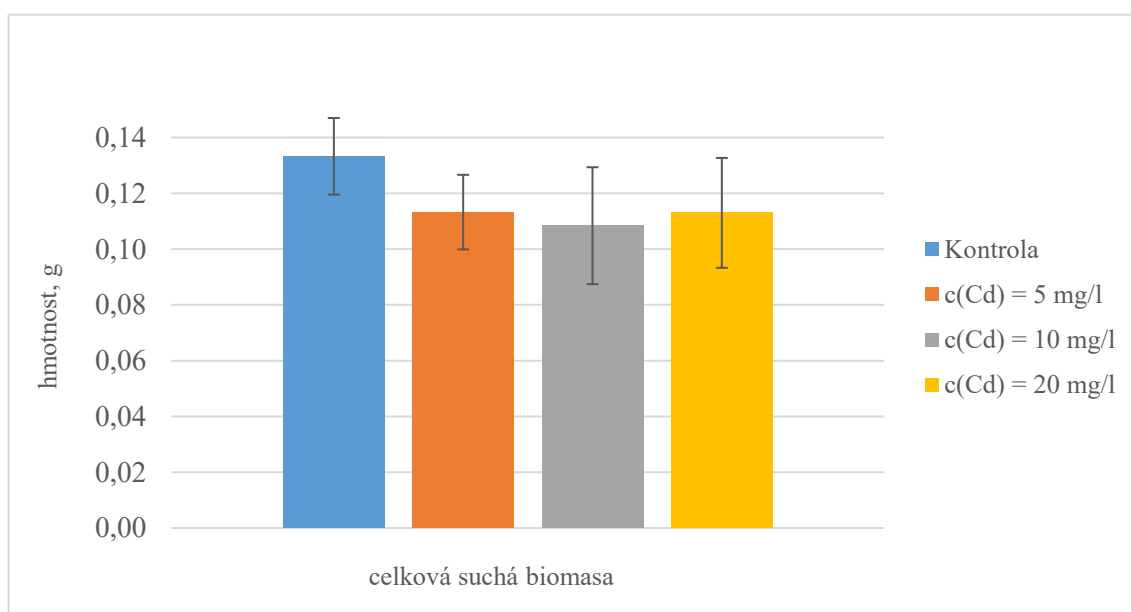
Na základě výsledků tohoto experimentu bylo rozhodnuto pro studium vlivu Cd a As na klíčivost a růst rostliny používat hydrolyzát o koncentraci 400 mg/l.

### 5.3 Vliv Cd a Cd v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Cílem experimentu bylo stanovit vliv těžkých kovů, konkrétně kadmia (Cd), na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a zjistit, jaké koncentrace mohou být toxické a do jaké míry ovlivní růst rostlin přidávek keratinového hydrolyzátu.

Experiment zahrnoval pěstování ječmene setého (*Hordeum vulgare*) v kontrolovaných podmínkách (konstantní teplota, klíčení za tmy) s přidavkem Cd v testovaných koncentracích 5, 10 a 20 mg/l, aby bylo možné sledovat jejich vliv na růst rostlin.

Kořínky ječmene u kontrolních rostlin vypadaly silné a pevné, v den ukončení experimentu byl počet kořínků 3 až 5. Vzhled rostlin, které byly podrobeny vlivům kadmia, se od kontrolních rostlin významně nelišil, a to i při nejvyšší testované koncentraci 20 mg/l. Počet kořínků v den ukončení experimentu byl 2 až 5. Nicméně pozorováno bylo lehké zhnědnutí kořenů u rostlin pěstovaných v roztoku kadmia o koncentraci 10 mg/l.



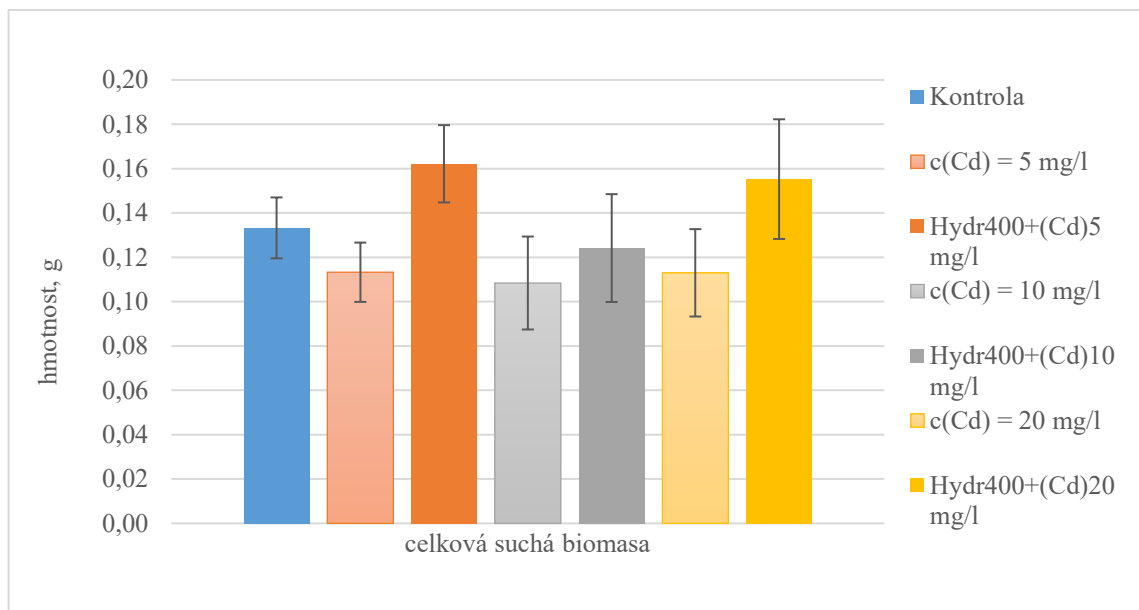
Obrázek 8 Vliv Cd ( $c = 5-20$  mg/l) na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*);  $n=3$ , průměr  $\pm$  směrodatná odchylka

Na Obrázku 8 je vidět, že aplikace kadmia (Cd) v koncentracích od 5 do 20 mg/l nemá statisticky významný nepříznivý vliv na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Nebyly pozorovány žádné zásadní rozdíly v hmotnosti biomasy mezi vzorky s přítomností kadmia a kontrolním vzorkem. Toto zjištění je v souladu s prací Liu a kol. (2003). Autoři Liu a kol. (2003) popsali, že nízké koncentrace Cd mají pozitivní vliv na růst rostlin česneku, avšak při vyšších a velmi vysokých koncentracích se jedná o výrazně toxickou látku. Odhlédneme-li od chyby stanovení, můžeme říci, že přítomnost kadmia snižuje produkci biomasy cca o 15 % oproti kontrole. Tato zjištění mohou naznačovat, že kadmium neprojevuje podstatnou fytotoxicitu při koncentracích, ve kterých byl testován.

Druhá část experimentu zahrnovala kultivaci ječmene setého (*Hordeum vulgare*) za kontrolovaných podmínek, které zahrnovaly konstantní teplotu a klíčení ve tmě, přičemž

rostliny byly vystaveny různým koncentracím Cd (5-20 mg/l) v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem ( $c(\text{Hydr})=400$  mg/l) s cílem sledovat jejich dopad na růst rostliny.

Rostliny pěstované s přidavkem keratinového hydrolyzátu a kadmia byly výrazně vitálnější a silnější s lépe vyvinutými primárními kořeny a pevnou, zelenou horní částí oproti rostlinám pěstovaným jen za přítomnosti kadmia. Počet kořínků byl 1 až 5.



Obrázek 9 Srovnání růstu ječmene setého (*Hordeum vulgare*) s přidáním Cd ( $c = 5-20$  mg/l) a Cd+Hydrolyzát ( $c = 400$  mg/l);  $n=3$ , průměr  $\pm$  směrodatná odchylka

Z Obrázku 9 je zřejmé, že využití keratinového hydrolyzátu zvyšuje toleranci ječmene setého (*Hordeum vulgare*) vůči negativním účinkům kadmia. Ve srovnání s kontrolním vzorkem, tj. bez keratinového hydrolyzátu, u kterého byla použita jen demineralizovaná voda, vzorky s kombinací keratinový hydrolyzát a Cd vykazují zvýšený růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*).

Bylo zjištěno, že kombinace kovu s keratinovým hydrolyzátem měla rovněž pozitivní vliv a účinně snižovala nepříznivé účinky stresu způsobeného samotným Cd. Dokonce při nízkých koncentracích Cd ( $c=10$  mg/l) s hydrolyzátem byl růst kořenů stimulován, bylo zjištěno mírné zvýšení prodlužování kořenů o 23 %. Obecně kořenový systém byl hustší a kompaktnější, také byly pevnější klíčky.

V případě koncentrací kadmia 5 mg/l a 20 mg/l přítomnost keratinového hydrolyzátu zlepšila narůst rostlin o 43 % a o 37 %. Něco méně bylo pozorováno při koncentraci kovu 10 mg/l, zvýšení bylo o 15 % ve srovnání s hmotností dosaženou rostlinami při růstu na „čistém“ kovu.



Kadmium má nepatrný inhibiční účinek na rostliny (Příloha P III). Koncentrace kadmia 5 mg/l způsobila 15,0 % inhibici oproti kontrole, při koncentraci 20 mg/l inhibice byla trochu vyšší - 15,2 %. Největší inhibiční efekt na růst rostlin byl zaznamenán při koncentraci kadmia 10 mg/l - 18,7 %.

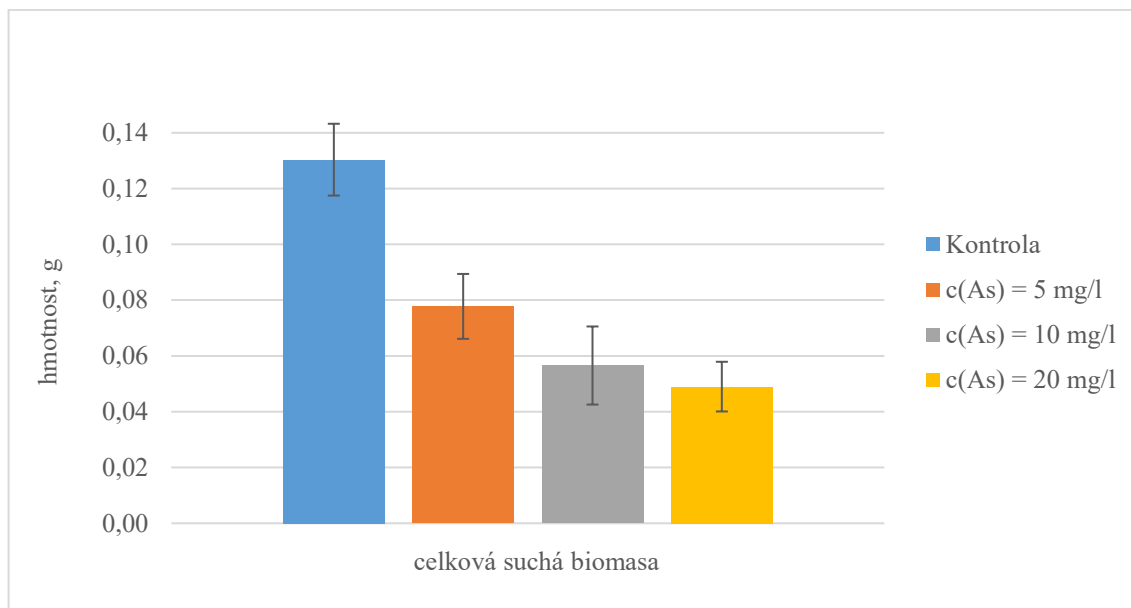
Byl zjištěn mírnější inhibiční účinek v případě využití keratinového hydrolyzátu (c=400 mg/l) s kadmii o koncentraci 10 mg/l na 18,7 %. Při aplikaci keratinového hydrolyzátu (c=400 mg/l) s kadmii o koncentraci 5 a 20 mg/l tento inhibiční účinek zcela vymizel.

#### **5.4 Vliv As a As v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)**

Cílem experimentu bylo posoudit vliv arsenu (As) na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*) za přítomnosti keratinového hydrolyzátu.

Obecně těžké kovy mají různé vlivy na rostliny, obvykle způsobují rostlině stres, u arsenu se projevující určitou degradací rostlin. Bylo pozorováno, že po aplikaci As na semena se rostliny velmi špatně rozvíjely anebo naprosto nebyly vyvinuté kořeny u některých rostlin, objevovaly se zhnědnuté konce kořenů. Také se poprvé objevil případ, kdy se nevyvinula horní část rostliny. To bylo zaznamenáno při vyšších koncentracích kovu, což může svědčit o negativním dopadu As na růst a vývoj ječmene setého, který se projevuje inhibičním efektem při vývoji primárních kořenů a také oddenkových článků rostliny.

Výsledkem působení arsenu je menší nárůst biomasy ve srovnání s kontrolou. Vizuálně rostliny vypadaly menší, což se potvrdilo po změření a vyhodnocení parametrů jako klíčivost, délka kořenů a horní části (Příloha P II).



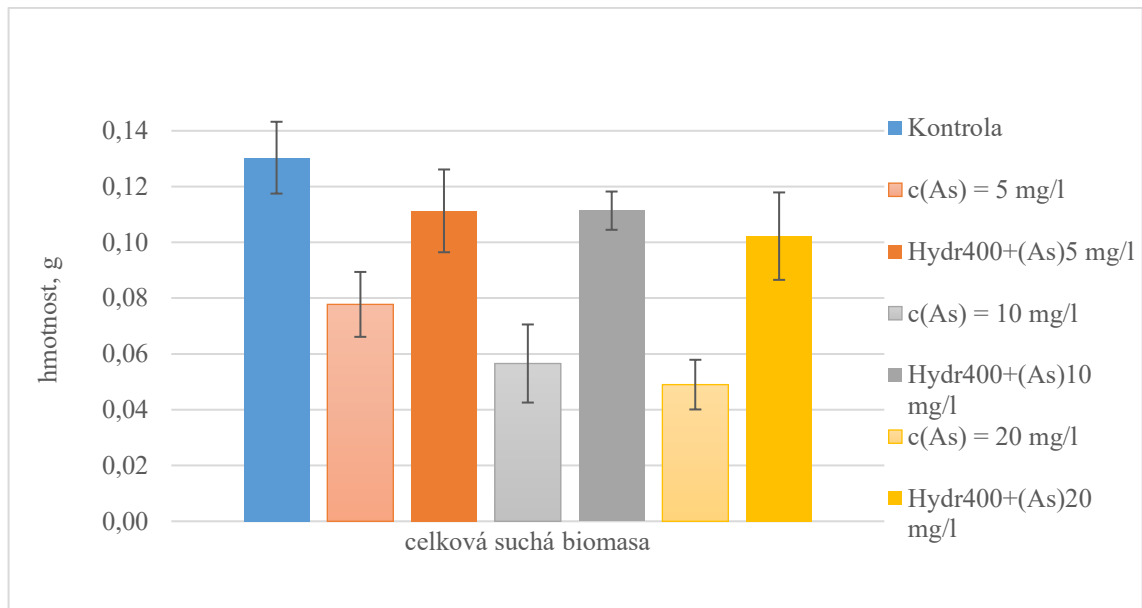
Obrázek 10 Vliv As ( $c = 5\text{-}20\text{ mg/l}$ ) na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*);  $n=3$ , průměr  $\pm$  směrodatná odchylka

Z Obrázku 10 jasně vyplývá, že s rostoucí koncentrací arsenu (As) dochází k negativnímu vlivu na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Taková dynamika signalizuje škodlivý dopad arsenu na růstové parametry rostlin a potvrzuje jeho potenciální toxické účinky, což může vést k narušení výživy, omezení růstu a vývoje.

Bylo pozorováno nejen snížení suché biomasy, ale i délky kořene způsobené vlivem arsenu. Snížení délky se zvětšovalo spolu se vzrůstající koncentrací těžkého kovu. Při aplikaci arsenu o koncentraci 5 mg/l bylo pozorováno snížení délky kořene o 32 %, při 10 mg/l a 20 mg/l As až o 78 % a 80 %. Z toho plyne, že zvýšené koncentrace As mají negativní dopad na procesy růstu a vývoje rostliny. Tato zjištění naznačují, že arsen již při nízkých koncentracích vykazuje nepříznivé účinky na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*).

Druhá část tohoto experimentu zahrnovala kultivaci rostlin ječmene setého (*Hordeum vulgare*), které byly vystaveny různým koncentracím arsenu (5-20 mg/l) s přidavkem keratinového hydrolyzátu (400 mg/l). Cílem bylo zkoumat jejich vzájemný vliv na růst rostlin a zjistit, jak keratinový hydrolyzát ovlivňuje růst rostlin pěstovaných v přítomnosti arsenu.

Semena ošetřená 5, 10 a 20 mg/l As s keratinovým hydrolyzátem 400 mg/l ukázala lepší růst a vývoj jak kořenové soustavy, tak oddenkové části. Všechny rostliny měly kořeny (mezi 2 až 5) a horní části na rozdíl od rostlin ošetřených As s koncentrací 10 a 20 mg/l, rovněž při tom se značně rozlišovala hmotnost rostlin pěstovaných s přidavkem hydrolyzátu a bez něj.



Obrázek 11 Srovnání růstu ječmene setého (*Hordeum vulgare*) s přidáním As ( $c = 5$ - $20$  mg/l) a As+Hydrolyzát ( $c = 400$  mg/l);  $n=3$ , průměr  $\pm$  směrodatná odchylka

Z Obrázku 11 můžeme provést srovnání růstu ječmene setého (*Hordeum vulgare*) s přidáním arsenu (As) v koncentracích od 5 do 20 mg/l a arsenu (As) týchž koncentrací spolu s hydrolyzátem o koncentraci 400 mg/l. U všech variant s přidavkem hydrolyzátu byla pozorována stimulace v produkci biomasy (zvýšení hmotnosti) a růstu nadzemních částí a kořenů rostlin ve srovnání s rostlinami, které rostly s přidáním jen As. Tyto hodnoty hmotnosti jsou stále nižší než hmotnost kontroly, ale vyšší než u samotného arsenu.

Při aplikaci As o koncentraci 10 a 20 mg/l s přidavkem hydrolyzátu byl pozorován největší přírůstek biomasy, až o 97 a 108 %, ve srovnání s aplikací samotného As o koncentraci 10 a 20 mg/l.

Dalším potvrzením nepříznivého vlivu arsenu se stalo vypočtení inhibice růstu (Příloha P II). Koncentrace arsenu 5 mg/l způsobila 40,3 % inhibici oproti kontrole, již při koncentraci 10 mg/l inhibice byla 56,6 %. Největší inhibiční efekt na růst rostlin byl zaznamenán při koncentraci arsenu 20 mg/l - 62,4 %.

V situaci, kdy byl aplikován keratinový hydrolyzát ( $c=400$  mg/l) s arsenem o koncentraci 5 a 10 mg/l, tento inhibiční účinek prudce klesnul až na 14,6 % v obou případech. Také při koncentraci arsenu 20 mg/l s keratinovým hydrolyzátem ( $c=400$  mg/l) byl zaznamenán pokles inhibice na 21,6 %.

Z výsledku vyplývá, že keratinový hydrolyzát má pozitivní účinek na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Obrázek 11 demonstruje, že přidání hydrolyzátu zvyšuje toleranci

rostlin vůči přítomnosti kovu. Z toho se může udělat předpoklad, že keratinový hydrolyzát má schopnost překonat stres způsobený přítomností těžkých kovů. Naopak při přidavku jen arsenu bylo evidentní, že rostlina strádala.

Z obou experimentů vyplývá, že cílový keratinový hydrolyzát neprojevuje fytotoxicitu, naopak zvyšuje toleranci a má mírné stimulační účinky v porovnání s výsledky získanými bez jeho přidavku. Výsledky těchto experimentů mohou být užitečné k ochraně zemědělských plodin před negativními účinky těžkých kovů.

### 5.5 Stanovení těžkých kovů atomovou absorpční spektrometrií (AAS) v suché biomase

Aby bylo možné prokázat, zda dochází ke zvýšené akumulaci As a Cd za přítomnosti keratinového hydrolyzátu v rostlinách, bylo provedeno stanovení jejich obsahu v celkové biomase ječmene setého na konci experimentu, tedy po 7 dnech kultivace. Naměřená data uvedená v Tabulce 5 jsou průměrnými hodnotami tří nezávislých měření.

Tabulka 5 Stanovení obsahu těžkých kovů v ječmenu setém (n = 3, průměr ± směrodatná odchylka)

Vzorky	c(kovu), mg/l	c(kovu) AAS, µg/g
Kontrola	-	pod limitem detekce
As	5	89,3±13,8
	10	56,7±19,4
	20	<b>63,2±17,3</b>
As + Hydrolyzát (c = 400 mg/l)	5	47,4±6,0
	10	105,7±5,4
	20	<b>178,9±31,1</b>
Cd	5	60,4±8,8
	10	157,3±20,5
	20	<b>284,8±44,4</b>
Cd + Hydrolyzát (c = 400 mg/l)	5	52,1±6,3
	10	164,6±17,1
	20	<b>385,0±49,4</b>

Z Tabulky 5 je patrný trend, že se zvyšující se koncentrací arsenu a kadmia se zvyšuje obsah kovů v rostlinách, přičemž lze vyzorovat, že za přítomnosti keratinového hydrolyzátu je naakumulované množství vyšší.

V případě Cd byl jeho nejnižší obsah zjištěn ve vzorcích s minimální testovanou koncentrací. V případě As se zvyšující koncentrací kovu docházelo k poklesu naakumulovaného množství v ječmenu. To lze přičítat inhibičnímu účinku samotného As a rostliny za takto vysokých testovaných koncentrací již nejsou schopny kov akumulovat.

Při koncentraci arsenu a kadmia 5 mg/l v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem byly naměřené hodnoty obsahu kovů vzhledem k směrodatné odchylce téměř srovnatelné v porovnání s případem bez přídavku hydrolyzátu a pozitivní účinek keratinového hydrolyzátu se neprojevil. Nejvyšší naměřené koncentrace kadmia v rostlinách ( $385,0 \pm 49,4$   $\mu\text{g/g}$  sušiny) byly dosaženy při přidání keratinového hydrolyzátu při testované koncentraci kadmia 20 mg/l, což je o 35 % více ve srovnání s rostlinami, které rostly bez přídavku hydrolyzátu. Toto naznačuje, že keratinový hydrolyzát může zvyšovat bioakumulaci kadmia v rostlinách.

Přítomnost keratinového hydrolyzátu s arsenem ( $c = 20$  mg/l) zajišťuje bioakumulaci ( $178,9 \pm 31,1$   $\mu\text{g/g}$ ) v ječmenu setém 2,8krát vyšší než bez přídavku hydrolyzátu ( $63,23 \pm 17,30$   $\mu\text{g/g}$ ).

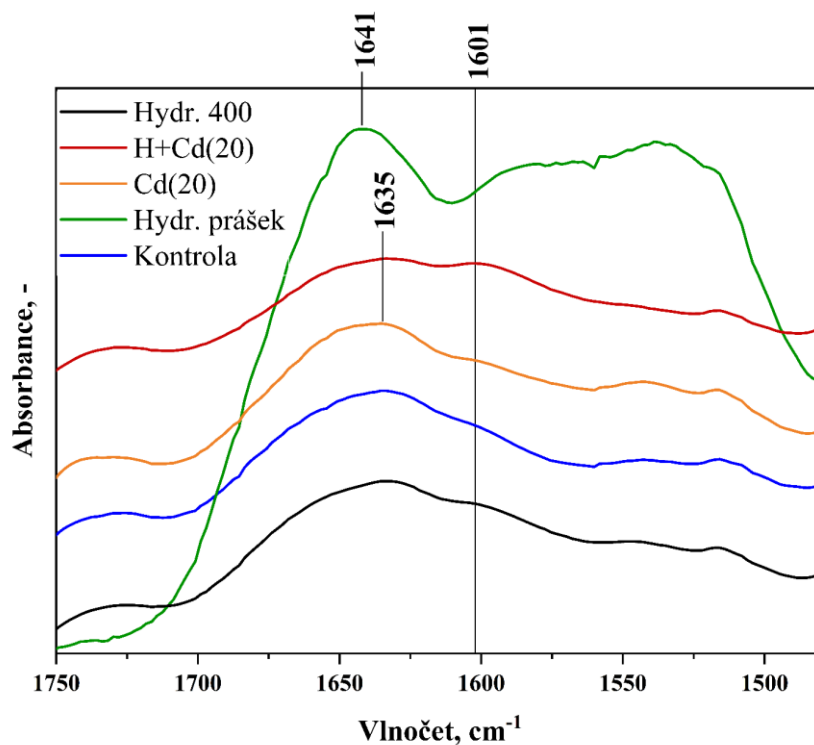
Z naměřených dat vyplývá, že ječmen setý za přítomnosti keratinového hydrolyzátu akumuluje jak kadmium, tak arsen ve zvýšených koncentracích do svých kořenů i nadzemních částí.

## 5.6 FTIR analýza

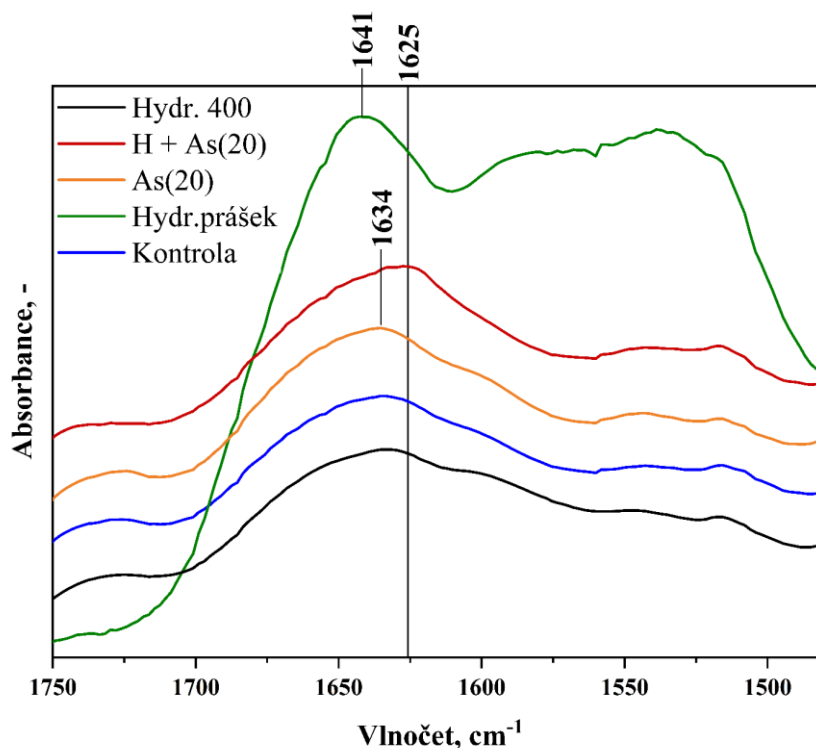
Soudek a kol. (2006) se ve své práci zmínili o mechanismech absorpce kontaminantu, jako je arsen, rostlinami. V různých typech rostlin, které byly pěstovány v prostředí s vysokými koncentracemi arsenu, je k udržení vysoké akumulace znečišťující látky v rostlině potřebná komplexace. Také Peer a kol. (2006) naznačuje, že zlepšení efektivity transportu arsenitanu ( $\text{AsO}_2^-$ ) z kořenů do výhonků bylo pozorováno po přidání dithiolového chelatačního činidla do kultivačního roztoku.

V doposud publikovaných pracích je uváděno, že keratinový hydrolyzát může působit jako chelatační činidlo. K objasnění reakce Cd a As v kořenech ječmene setého byla použita FTIR spektroskopie. Vzhledem k tomu, že FTIR spektrum samotného kořene rostliny je složité a

„nepřehledné“ (viz Příloha P IV a Příloha P V), je na Obr. 12 a 13 znázorněno FTIR spektrum kořene ječmene setého pouze ve spektrálním rozsahu  $1750\text{ cm}^{-1} - 1450\text{ cm}^{-1}$ . V této spektrální oblasti byly zaznamenány významné změny oproti kontrole. Pro názornost je zde uvedeno také spektrum čistého keratinového hydrolyzátu v práškové formě, pro který je typický absorpční pás  $1641\text{ cm}^{-1}$  odpovídající karboxylové skupině (Alsakhawy et al., 2022).



Obrázek 12 FTIR spektrum kořenů vegetativní části rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) pěstovaného ve stresových podmínkách Cd (20 mg/l) a Cd (20 mg/l) v přítomnosti keratinového hydrolyzátu v rozsahu  $1750\text{ cm}^{-1} - 1450\text{ cm}^{-1}$



Obrázek 13 FTIR spektrum kořenů vegetativní části rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) pěstovaného ve stresových podmínkách As (20 mg/l) a As (20 mg/l) v přítomnosti keratinového hydrolyzátu v rozsahu  $1750\text{ cm}^{-1}$  –  $1450\text{ cm}^{-1}$

Stingu a kol. (2012) uvádí, že změny absorbance pozorované při  $1639\text{ cm}^{-1}$ ,  $1633\text{ cm}^{-1}$  lze přiřadit chelatované formě karbonylu na karboxylové skupině.

Pro Cd byl pozorován posun z  $1635\text{ cm}^{-1}$  na  $1633\text{ cm}^{-1}$  a zvýšení intenzity adsorpčního pásu při  $1601\text{ cm}^{-1}$ . Při kombinaci hydrolyzátu s arsenitanem sodným dochází k posouvání tohoto adsorpčního pásu z hodnoty  $1634\text{ cm}^{-1}$  až na hodnotu  $1625\text{ cm}^{-1}$ . Tento posun může být způsoben vznikem koordinační vazby této skupiny s atomy kadmia, resp. arsenu (Guo et al., 2022).

## 5.7 Stanovení chlorofylů spektrofotometricky

Stanovení chlorofylu může poskytnout informace o fotosyntetické aktivitě rostlin během růstu a může být také indikátorem celkového zdraví rostlin. Působením těžkých kovů na rostliny dochází ke změnám na úrovni horní zelené části. V důsledku toho může dojít k omezení její fotosyntetické funkce. To často vede ke snížení množství fotosyntetického pigmentu, konkrétně chlorofylu. Snížená hladina chlorofylu může být důsledkem jak degradace tylakoidů, tak inhibice jeho biosyntézy. Tento stav snížené fotosyntetické aktivity může vést k menšímu přírůstku biomasy rostlin.

Tabulka 6 Obsah fotosyntetických pigmentů chlorofylu ( $\mu\text{g/g}$ ) u ječmene setého pěstovaného za podmínek stresu kadmíem a arsenem ( $n = 3$ , průměr  $\pm$  směrodatná odchylka)

Vzorky	Chl a, $\mu\text{g/g}$	Chl b, $\mu\text{g/g}$	Celkový chl, $\mu\text{g/g}$	Chl a/Chl b
Kontrola	1596,7 $\pm$ 505,35	892,3 $\pm$ 107,35	2489,0 $\pm$ 564,19	1,79
Hydr400	2413,6 $\pm$ 48,92	1181,8 $\pm$ 143,45	3595,5 $\pm$ 185,42	2,04
Cd 5	2159,2 $\pm$ 49,52	1110,9 $\pm$ 42,05	3270,1 $\pm$ 15,61	1,94
Cd 10	1915,7 $\pm$ 689,35	1083,4 $\pm$ 305,09	2999,1 $\pm$ 941,68	1,77
Cd 20	2111,8 $\pm$ 316,91	1160,3 $\pm$ 247,61	3272,2 $\pm$ 563,76	1,82
Cd 5 + Hydr400	1774,6 $\pm$ 187,31	893,4 $\pm$ 111,22	2668,0 $\pm$ 282,11	1,99
Cd 10 + Hydr400	2029,5 $\pm$ 391,87	1074,2 $\pm$ 280,13	3103,7 $\pm$ 661,11	1,89
Cd 20 + Hydr400	2392,1 $\pm$ 91,50	1520,7 $\pm$ 222,96	<b>3912,8<math>\pm</math>197,67</b>	1,57
As 5	1923,1 $\pm$ 321,20	1053,2 $\pm$ 181,00	<b>2976,3<math>\pm</math>500,54</b>	1,83
As 10	2229,7 $\pm$ 766,23	1135,8 $\pm$ 632,91	3365,5 $\pm$ 545,73	1,96
As 20	1986,9 $\pm$ 419,64	1872,9 $\pm$ 748,14	3859,8 $\pm$ 1167,60	1,06
As 5 + Hydr400	2254,0 $\pm$ 433,80	1494,1 $\pm$ 122,22	<b>3748,1<math>\pm</math>360,68</b>	1,51
As 10 + Hydr400	2182,7 $\pm$ 387,85	1556,8 $\pm$ 560,73	3739,5 $\pm$ 923,10	1,40
As 20 + Hydr400	2231,4 $\pm$ 438,97	1638,4 $\pm$ 919,84	<b>3869,8<math>\pm</math>1142,48</b>	1,36

Lichtenthaler, (1987) uvádí, že chlorofyly *a* a *b* se vyskytují v poměru přibližně 3:1. Tento poměr mohou měnit růstové podmínky a faktory prostředí. Při vysokém osvětlení a slunci chlorofyly vykazují poměr 3,2 až 4, zatímco ve stínu rostliny mají nižší hodnoty tohoto poměru (např. 2,5 až 2,9). Sice z výsledku stanovení chlorofylu u kontroly vyplývá, že dosažený poměr není dostatečným, ale vzhledem k laboratorním podmínkám, byl tento experiment vyhodnocen jako dostačující pro základní posouzení vlivu keratinového hydrolyzátu a těžkých kovů.



Z Tab. 6 je vidět, že přítomnost keratinového hydrolyzátu v růstovém médiu neměla významný účinek na biosyntézu chlorofylu v závislosti na koncentraci arsenu a kadmia, ale můžou se pozorovat některé pozitivní změny. Odhlédneme-li od chyby stanovení, můžeme vypočítat, že mírný účinek na celkový obsah fotosyntetizujícího pigmentu byl pozorován při použití hydrolyzátu s koncentracemi kadmia 20 mg/l. Pokud jde o hydrolyzát s arsenem, byl zaznamenán zvýšený účinek při koncentraci 20 mg/l. Na druhou stranu, ale můžeme říci, že samotné kovy při testovaných koncentracích nemají prokazatelně negativní účinek.

Zajímavým případem je zvýšení celkového chlorofylu ( $3748,1 \pm 360$ , 68  $\mu\text{g/g}$ ) při aplikaci keratinového hydrolyzátu s As (5 mg/l). To představuje nárůst o 26 % ve srovnání s množstvím celkového chlorofylu u rostlin pěstovaných za přítomnosti 5 mg/l As. Naopak, u kadmia nebyl zaznamenán žádný podobný účinek.

## ZÁVĚR

Na základě rešerše dostupné vědecké literatury byly stanoveny cíle experimentální části práce. Hlavním cílem bylo určit, zda jsou rostliny ječmene setého schopny akumulovat arsen a kadmium za přítomnosti keratinového hydrolyzátu.

Nejprve byl proveden test klíčivosti rostlin u vybraných rostlinných druhů, na jehož základě byl pro další experimenty vybrán ječmen setý (*Hordeum vulgare*). Ječmen vykázal nejvíc přijatelnou klíčivost, která dosáhla 96 %.

Byl zkoumán vliv keratinového hydrolyzátu získaného enzymatickou hydrolyzou na klíčivost a růst kořenů rostlin. Testováním různých koncentrací hydrolyzátu se zjistilo, že se do určité míry zvyšuje nárůst biomasy při aplikaci všech testovaných koncentrací keratinového hydrolyzátu. Jako optimální byla vyhodnocena koncentrace 400 mg/l. Tato koncentrace je neúčinnější pro tvorbu celkové biomasy rostlin, protože byl pozorován nárůst biomasy o 39 % ve srovnání s kontrolou, což určilo směr dalších experimentů. Během klíčení se u rostlin pravidelně rozvíjely primární kořeny a oddenková část. Rostliny měly rozvinutý kořenový systém, s počtem kořenů 3 až 6.

Následně byl testován vliv Cd nebo As (5-20 mg/l) a těchto koncentrací Cd nebo As v přítomnosti keratinového hydrolyzátu (c=400 mg/l) na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Při koncentracích, které byly testované, kadmium neprojevovalo zásadní negativní vliv na množství biomasy rostlin, nevykazovalo významnou fytotoxicitu. Samotné kadmium mělo jen mírný inhibiční účinek na růst ječmene. Nejvyššího procenta inhibice bylo dosaženo při testované koncentraci 10 mg/l a to 18,7 %.

Kombinace kadmia s keratinovým hydrolyzátem měla pozitivní efekt a účinně snižovala nepříznivé účinky stresu způsobeného samotným kadmiiem. Při koncentraci kadmia (10 mg/l) hydrolyzáat mírně stimuloval prodlužování kořenů, cca o 23 %. Vyšší koncentrace kadmia (5 a 20 mg/l) s hydrolyzátem vedly ke zvýšenému nárůstu biomasy o 43 % a 37 % ve srovnání se samotným kadmiiem.

Arsen již při nižších koncentracích vykazoval výrazně negativní dopad na rostliny – špatný růst, zhnědnutí a zkrácení kořenů až o 78-80 % při koncentraci 10 a 20 mg/l. Růst rostlin byl významně snížen vlivem arsenu a jeho vysokou toxicitou. Tomu odpovídalo také vysoké procento inhibice růstu u arsenu: 40,3 % při 5 mg/l, 56,6 % při 10 mg/l a 62,4 % při 20 mg/l.

Aplikace arsenu 10 a 20 mg/l spolu s keratinovým hydrolyzátem naopak měla stimulační efekt na tvorbu biomasy, nárůst až 97-108 % oproti rostlinám pěstovaným v přítomnosti samotného arsenu.

Pomocí AAS byl měřen obsah těchto těžkých kovů v rostlinách. Výsledky analýzy potvrdily, že obsah As a Cd ve vzorcích rostl s jejich zvyšujícími se koncentracemi. Pozitivním zjištěním bylo, že přidavek keratinového hydrolyzátu výrazně zvyšoval akumulaci As a Cd v rostlinách ječmene, a to až několikanásobně ve srovnání s kontrolou bez hydrolyzátu.

Nejvyšší naměřené koncentrace Cd ( $385 \mu\text{g/g} \pm 49,4$ ) byly při 20 mg/l Cd s hydrolyzátem, což je o 35 % více než bez hydrolyzátu. Přítomnost keratinového hydrolyzátu při 20 mg/l As vedla k 2,8násobnému zvýšení akumulace: As ( $178,9 \mu\text{g/g} \pm 31,1$ ) oproti samotnému As ( $63,2 \mu\text{g/g} \pm 17,3$ ). FTIR analýza ukázala specifické interakce mezi keratinovým hydrolyzátem a Cd nebo As, jako je tvorba chelatovaných komplexů.

Analýza chlorofylu ukázala, že samotné kovy při testovaných koncentracích neměly výrazně negativní účinek. Hydrolyzát naopak mírně stimuloval biosyntézu chlorofylu, nejvíce při kombinaci s 20 mg/l As nebo Cd.

Tyto výsledky ukazují, že keratinový hydrolyzát má potenciál zvyšovat akumulaci těžkých kovů v rostlinách, což může vést k dalšímu pokroku ve fytoremediaci. Jsou však zapotřebí další výzkumy pro potvrzení tohoto pozitivního efektu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ALSAKHAWY, Marwa A.; ABDELMONSIF, Doaa A.; HAROUN, Medhat a SABRA, Sally A., 2022. Naringin-loaded Arabic gum/pectin hydrogel as a potential wound healing material. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. Roč. 222, s. 701-714. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.200>. [cit. 2024-05-06].

BARTUCCA, Maria Luce; CERRI, Martina; DEL BUONO, Daniele a FORNI, Cinzia, 2022. Use of Biostimulants as a New Approach for the Improvement of Phytoremediation Performance—A Review. Online. *Plants*. Roč. 11, č. 15. ISSN 2223-7747. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants11151946>. [cit. 2024-03-02].

BLAYLOCK, Michael J.; SALT, David E.; DUSHENKOV, Slavik; ZAKHAROVA, Olga; GUSSMAN, Christopher et al., 1997. Enhanced Accumulation of Pb in Indian Mustard by Soil-Applied Chelating Agents. Online. *Environmental Science & Technology*. 1997-03-01, roč. 31, č. 3, s. 860-865. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/es960552a>. [cit. 2024-03-22].

BREZINOVÁ, Jana, 2020. *Stanovení ekotoxických vlivů produktů získaných z bílkovinných odpadů na vyšší rostliny*. Online. Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. 2020. Dostupné z: <https://theses.cz/id/rgk883/>. [cit. 2024-04-19].

CALLEGARO, Kelly; BRANDELLI, Adriano a DAROIT, Daniel Joner, 2019. Beyond plucking: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. Online. *Waste Management*. Roč. 95, s. 399-415. ISSN 0956053X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.06.040>. [cit. 2023-11-09].

COLLA, Giuseppe; NARDI, Serenella; CARDARELLI, Mariateresa; ERTANI, Andrea; LUCINI, Luigi et al., 2015. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. Online. *Scientia Horticulturae*. Roč. 196, s. 28-38. ISSN 03044238. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>. [cit. 2024-02-16].

*Celková spotřeba potravin loni vzrostla*, 2021. Online. 6.12.2021. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/celkova-spotreba-potravin-loni-vzrostla>. [cit. 2023-11-01].

DU, Ling; WU, Dongming; YANG, Xi; XU, Li; TIAN, Xu et al., 2024. Joint toxicity of cadmium (II) and microplastic leachates on wheat seed germination and seedling growth. Online. *Environmental Geochemistry and Health*. Roč. 46, č. 5. ISSN 0269-4042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10653-024-01942-3>. [cit. 2024-04-25].

EVANGELOU, Michael W.H.; EBEL, Mathias a SCHAEFFER, Andreas, 2006. Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. Online. *Chemosphere*. Roč. 63, č. 6, s. 996-1004. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.042>. [cit. 2024-03-23].

EVANGELOU, Michael W.H.; EBEL, Mathias a SCHAEFFER, Andreas, 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. Online. *Chemosphere*. Roč. 68, č. 6, s. 989-1003. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.062>. [cit. 2024-03-22].

EVANGELOU, Michael W.H.; EBEL, Mathias; KOERNER, Andrea a SCHAEFFER, Andreas, 2008. Hydrolysed wool: A novel chelating agent for metal chelant-assisted phytoextraction from soil. Online. *Chemosphere*. Roč. 72, č. 4, s. 525-531. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.063>. [cit. 2024-03-24].

GABRIELE, Ilaria; BIANCO, Francesco; RACE, Marco; PAPIRIO, Stefano a ESPOSITO, Giovanni, 2023. Phytoremediation of PAH- and Cu-Contaminated Soil by *Cannabis sativa* L: Preliminary Experiments on a Laboratory Scale. Online. *Sustainability*. Roč. 15, č. 3. ISSN 2071-1050. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/su15031852>. [cit. 2024-04-19].

GEZGINCIOĞLU, Ebru a ATICI, Ökkeş, 2023. Chicken feather protein hydrolysate improves cold resistance by upregulating physiologic and biochemical responses of wheat (*Triticum aestivum* L.). Online. *Environmental Science and Pollution Research*. Roč. 30, č. 2, s. 3593-3605. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22013-z>. [cit. 2024-02-17].

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E. a MONTERO, M.P., 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Online. *Food Hydrocolloids*. Roč. 25, č. 8, s. 1813-1827. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>. [cit. 2024-02-28].

GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A.; DE JONG, E.V. a BRANDELLI, A., 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. Online. *Animal Feed Science and Technology*. Roč. 126, č. 1-2, s. 135-144. ISSN 03778401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.06.002>. [cit. 2023-11-09].

GUO, Min; SHI, Lili; GU, Wen a WU, Wenzhu, 2022. Adsorption and Its Mechanism of Arsenate in Aqueous Solutions by Red Soil. *Water*. Roč. 14, č. 4, s. 579. ISSN 2073-4441.

GUPTA, Shreya; SHARMA, Swati; AICH, Amit; VERMA, Amit Kumar; BHUYAR, Prakash et al., 2023. Chicken Feather Waste Hydrolysate as a Potential Biofertilizer for Environmental Sustainability in Organic Agriculture Management. Online. *Waste and Biomass Valorization*. Roč. 14, č. 9, s. 2783-2799. ISSN 1877-2641. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02123-6>. [cit. 2023-11-01].

HALIM, M.; CONTE, P. a PICCOLO, A., 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. Online. *Chemosphere*. Roč. 52, č. 1, s. 265-275. ISSN 00456535. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00185-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00185-1). [cit. 2024-02-16].

IBAÑEZ, Sabrina G.; TRAVAGLIA, Claudia N.; MEDINA, María I. a AGOSTINI, Elizabeth, 2021. Vicia villosa Roth: a cover crop to phytoremediate arsenic polluted environments. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. Roč. 28, č. 29, s. 38604-38612. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13529-x>. [cit. 2024-04-23].

KARIM, A.A. a BHAT, Rajeev, 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Online. *Food Hydrocolloids*. Roč. 23, č. 3, s. 563-576. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>. [cit. 2024-02-15]

KOS, Boštjan a LEŠTAN, Domen, 2004. Chelator induced phytoextraction and in situ soil washing of Cu. Online. *Environmental Pollution*. Roč. 132, č. 2, s. 333-339. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.004>. [cit. 2024-03-23].

KREJČÍ, Ondřej, 2014. *Zpracování keratinových odpadů a možnosti aplikací redukováných forem keratinu: Keratin waste treatment and application possibilities of reduced forms of*

*keratin : teze disertační práce*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7454-435-4.

LEÓN-LÓPEZ, Arely; MORALES-PEÑALOZA, Alejandro; MARTÍNEZ-JUÁREZ, Víctor Manuel; VARGAS-TORRES, Apolonio; ZEUGOLIS, Dimitrios I. et al., 2019. Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. Online. *Molecules*. Roč. 24, č. 22. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24224031>. [cit. 2024-02-25].

LICHTENTHALER, Hartmut K., 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Online. In: *Plant Cell Membranes. Methods in Enzymology*. Elsevier, s. 350-382. ISBN 9780121820480. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1). [cit. 2024-05-05].

LIU, D.; JIANG, W. a GAO, X., 2003. Effects of Cadmium on Root Growth, Cell Division and Nucleoli in Root Tip Cells of Garlic. Online. *Biologia plantarum*. 2003-7-1, roč. 46, č. 1, s. 79-83. ISSN 00063134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1027384932338>. [cit. 2024-04-28].

LIU, Jia Nv; ZHOU, Qi Xing; WANG, Song a SUN, Ting, 2009. Cadmium tolerance and accumulation of *Althaea rosea* Cav. and its potential as a hyperaccumulator under chemical enhancement. Online. *Environmental Monitoring and Assessment*. Roč. 149, č. 1-4, s. 419-427. ISSN 0167-6369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0218-5>. [cit. 2024-03-22].

MAHMOOD, Tariq; ISLAM, K. R.; MUHAMMAD, S. Toxic effects of heavy metals on early growth and tolerance of cereal crops. *Pakistan journal of botany*, 2007, 39.2: 451.

MATINONG, Andrea Marie E.; CHISTI, Yusuf; PICKERING, Kim L. a HAVERKAMP, Richard G., 2022. Collagen Extraction from Animal Skin. Online. *Biology*. Roč. 11, č. 6. ISSN 2079-7737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology11060905>. [cit. 2024-02-28].

MEERS, E.; RUTTENS, A.; HOPGOOD, M.J.; SAMSON, D. a TACK, F.M.G., 2005. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. Online. *Chemosphere*. Roč. 58, č. 8, s. 1011-1022. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.047>. [cit. 2024-03-22].

MOKREJŠ, Pavel a LANGMAIER, Ferdinand, 2008. *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7318-674-6. [cit. 2024-02-21].

MOKREJŠ, Pavel; SUKOP, Svatopluk a KREJČÍ, Ondřej, 2014. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. *Chemické listy*. Roč. 2014, č. 108, s. 26–31. ISSN 0009-2770. [cit. 2024-02-08].

MOKREJS, Pavel; SVOBODA, Petr; HRNCIRIK, Josef; JANACOVA, Dagmar a VASEK, Vladimír, 2011. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. Online. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*. Roč. 29, č. 3, s. 260-267. ISSN 0734-242X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0734242X10370378>. [cit. 2024-05-02].

MUHAMMAD, Dawood; CHEN, Fei; ZHAO, Jing; ZHANG, Guoping a WU, Feibo, 2009. Comparison of EDTA- and Citric Acid-Enhanced Phytoextraction of Heavy Metals in Artificially Metal Contaminated Soil by *Typha Angustifolia*. Online. *International Journal of Phytoremediation*. 2009-08-14, roč. 11, č. 6, s. 558-574. ISSN 1522-6514. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15226510902717580>. [cit. 2024-03-22].

MUNZUROGLU, O. a GECKIL, H., 2002. Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. Online. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Roč. 43, č. 2, s. 203-213. ISSN 0090-4341. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1116-4>. [cit. 2024-04-25].

*NÁPLŇ PUBLIKOVANÝCH POLOŽEK: Maso v hodnotě na kosti*, 2021. Online. In: Český statistický úřad. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin#>. [cit. 2024-03-20].

PEER, Wendy Ann; BAXTER, Ivan R.; RICHARDS, Elizabeth L.; FREEMAN, John L. a MURPHY, Angus S., 2006. Phytoremediation and hyperaccumulator plants. Online. In: TAMAS, Markus J. a MARTINOIA, Enrico (ed.). *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Topics in Current Genetics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 299-340. ISBN 978-3-540-22175-3. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/4735\\_100](https://doi.org/10.1007/4735_100). [cit. 2024-04-29].



POPKO, Małgorzata; WILK, Radosław; GÓRECKA, Helena; CHOJNACKA, Katarzyna a GÓRECKI, Henryk, 2015. Assessment of New NKSMg Fertilizer Based on Protein Hydrolysate of Keratin in Pot Experiments. Online. *Polish Journal of Environmental Studies*. Roč. 24, s. 1765-1772. ISSN 1230-1485. Dostupné z: <https://doi.org/10.15244/pjoes/36823>. [cit. 2024-02-17].

QUARSHIE, Samuel De-Graft; XIAO, Xinfeng a ZHANG, Linlin, 2021. Enhanced Phytoremediation of Soil Heavy Metal Pollution and Commercial Utilization of Harvested Plant Biomass: a Review. Online. *Water, Air, & Soil Pollution*. Roč. 232, č. 11. ISSN 0049-6979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05430-7>. [cit. 2024-03-21].

QUARTACCI, M.F.; BAKER, A.J.M. a NAVARI-IZZO, F., 2005. Nitrilotriacetate- and citric acid-assisted phytoextraction of cadmium by Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czernj, Brassicaceae). Online. *Chemosphere*. Roč. 59, č. 9, s. 1249-1255. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.053>. [cit. 2024-03-22].

REDJALA, Tanegmart; STERCKEMAN, Thibault a MOREL, Jean Louis, 2009. Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. Online. *Environmental and Experimental Botany*. Roč. 67, č. 1, s. 235-242. ISSN 00988472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.012>. [cit. 2024-05-02].

ROXANA, Vidican; MIHAIESCU, Tania; PLESA, Anca a CRIȘAN, Ioana. Opportunities for the Utilization of Phytoremediation Biomass Rich in Heavy Metals. Online. *ProEnvironment Promediu*. Roč. 2020, č. 13(43), s. 77-81. Dostupné z: <https://journals.usamvcluj.ro/index.php/promediu/article/view/14005>. [cit. 2024-03-21].

SHEDEED, Zeinab A. a FARAHAT, Emad A., 2023. Alleviating the toxic effects of Cd and Co on the seed germination and seedling biochemistry of wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Azolla pinnata*. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. Roč. 30, č. 30, s. 76192-76203. ISSN 1614-7499. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27566-1>. [cit. 2024-04-25].

SIONKOWSKA, A.; SKOPINSKA-WIŚNIEWSKA, J.; KOZŁOWSKA, J.; PŁANECKA, A. a KURZAWA, M., 2011. Photochemical behaviour of hydrolysed keratin. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. Roč. 33, č. 6, s. 503-508. ISSN 01425463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00662.x>. [cit. 2024-02-25].

SOLCOVA, Olga; ROUSKOVA, Milena; SABATA, Stanislav; DLASKOVA, Martina; DEMNEROVA, Katerina et al., 2023. Removal of Heavy Metals from Industrial Brownfields by Hydrolysate from Waste Chicken Feathers in Intention of Circular Bioeconomy. Online. *Environmental Advances*. Roč. 16. ISSN 26667657. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2024.100521>. [cit. 2024-03-27].

Soudek, P., Petrová, Š., Benešová, D., Kotyza, J., & Vaněk, T., 2008. Fytoremediation and Possibilities of Increasing Its Effectivity. *Chemické Listy*. Roč 2008, č. 102(5), s. 346-352. ISSN 0009-2770. Získáno z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1652>. [cit. 2024-03-03].

Soudek, P., Víchová, L., Valenová, Š., Podlipná, R., & Vaněk, T. 2006. Arsenic and Its Uptake by Plants. *Chemické Listy*, Roč 2006, č. 100(5), s. 323-329. Získáno z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1926>. [cit. 2024-04-27].

*Spotřeba masa v hodnotě na kosti (na obyvatele za rok)*, 2021. Online. In: Český statistický úřad. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin>. [cit. 2024-03-16].

STINGU, Alina; VOLF, Irina; POPA, Valentin I. a GOSTIN, Irina, 2012. New approaches concerning the utilization of natural amendments in cadmium phytoremediation. Online. *Industrial Crops and Products*. Roč. 35, č. 1, s. 53-60. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.005>. [cit. 2024-04-17].

SÚKENÍK, Martin. *Vývoj nové generace bioinokulantů a studium jejich biologické aktivity* [online]. Brno, 2023 [cit. 2024-03-20]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/sjwgv1/>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.

TASKIN, Mesut; OZKAN, Behzat; ATICI, Okkes a AYDOGAN, Mehmet Nuri, 2011. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. Online. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011-12-02, roč. 63, č. 5, s. 597-602. ISSN 0963-7486. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.640309>. [cit. 2024-03-02].

TIMORSHINA, Svetlana; POPOVA, Elizaveta a OSMOLOVSKIY, Alexander, 2022. Sustainable Applications of Animal Waste Proteins. Online. *Polymers*. Roč. 14, č. 8. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14081601>. [cit. 2024-02-24].

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

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

- AAS Atomová absorpční spektrometrie
- APCA Kyselina aminopolykarboxylová
- CDTA Kyselina cyklohexan diaminoethan tetra-octová
- ČR Česká republika
- DTPA Kyselina diethylentriaminpentaoctová
- EDDS Ethylendiamindisukcinát
- EDTA Kyselina ethylendiamintetraoctová
- EGTA Kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
- FTIR Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
- Hydr Keratinový hydrolyzát
- IAA Kyselina indol-3-octová
- LMWOA Nízkomolekulární organické kyseliny
- NPK Hnojiva obsahující dusík (N), fosfor (P), draslík (K)
- NTA Kyselina nitrilotrioctová
- PAH Polycyklické aromatické uhlovodíky
- PHE Fenanthren
- PYR Pyren
- QCM certifikovaný referenční materiál
- SDS Dodecylsulfát sodný
- TOC Total Organic Carbon (Celkový organický uhlík)
- USA Spojené státy americké
- UV Ultrafialové záření
- VOC Těkavé organické látky

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Průměrná spotřeba masa od roku 1989 do roku 2020 uváděná v hodnotě na kosti na obyvatele za rok (Převzato Spotřeba masa v hodnotě na kosti (na obyvatele za rok), (2021)) .....	12
Obrázek 2 Schéma zpracování kuřecího peří na keratinový hydrolyzát .....	40
Obrázek 3 Fotografie – screeningový test klíčivosti na Petriho miskách rostlin technické konopí seté ( <i>Cannabis sativa</i> ) a ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> ), část připravených vzorků, (foto Licinar, 2024).....	41
Obrázek 4 Fotografie – klíčení rostlin ječmenu setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) pod lampou, (foto Licinar, 2024) .....	47
Obrázek 5 Fotografie – ukázkové foto vyklíčených rostlin ječmenu setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) pod lampou, (foto Licinar, 2024) .....	47
Obrázek 6 Fotografie – ukázkové foto připravených vzorků rostlin ječmenu setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) pro spektrofotometrické měření, (foto Licinar, 2024) .....	48
Obrázek 7 Vliv vybraných koncentrací (200-500 mg/l) keratinového hydrolyzátu na celkovou hmotnost biomasy ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ); n=3, průměr ± směrodatná odchylka.....	54
Obrázek 8 Vliv Cd (c = 5-20 mg/l) na růst ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ); n=3, průměr ± směrodatná odchylka .....	55
Obrázek 9 Srovnání růstu ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) s přidáním Cd (c = 5-20 mg/l) a Cd+Hydrolyzát (c = 400 mg/l); n=3, průměr ± směrodatná odchylka.....	56
Obrázek 10 Vliv As (c = 5-20 mg/l) na růst ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ); n=3, průměr ± směrodatná odchylka .....	58
Obrázek 11 Srovnání růstu ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) s přidáním As (c = 5-20 mg/l) a As+Hydrolyzát (c = 400 mg/l); n=3, průměr ± směrodatná odchylka.....	59
Obrázek 12 FTIR spektrum kořenů vegetativní části rostliny ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) pěstovaného ve stresových podmínkách Cd (20 mg/l) a Cd (20 mg/l) v přítomnosti keratinového hydrolyzátu v rozsahu 1750 cm <sup>-1</sup> – 1450 cm <sup>-1</sup> .....	62
Obrázek 13 FTIR spektrum kořenů vegetativní části rostliny ječmene setého ( <i>Hordeum vulgare</i> ) pěstovaného ve stresových podmínkách As (20 mg/l) a As (20 mg/l) v přítomnosti keratinového hydrolyzátu v rozsahu 1750 cm <sup>-1</sup> – 1450 cm <sup>-1</sup> .....	63

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Potenciální možnosti využití hydrolyzátů jako hnojiv (převzato a upraveno Callegaro a kol. (2019)) .....	23
Tabulka 2 Příprava roztoků těžkých kovů v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem .....	43
Tabulka 3 Mineralizační program.....	45
Tabulka 4 Stanovení klíčivosti a vitality semen .....	52
Tabulka 5 Stanovení obsahu těžkých kovů v ječmenu setém (n = 3, průměr ± směrodatná odchylka) .....	60
Tabulka 6 Obsah fotosyntetických pigmentů chlorofylu ( $\mu\text{g/g}$ ) u ječmene setého pěstovaného za podmínek stresu kadmíem a arsenem (n = 3, průměr ± směrodatná odchylka) .....	64

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Naměřené a vyhodnocené parametry při aplikaci keratinového hydrolyzátu na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Příloha P II: Naměřené a vyhodnocené parametry při aplikaci arsenu a kombinaci arsenu s keratinovým hydrolyzátem na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Příloha P III: Naměřené a vyhodnocené parametry při aplikaci kadmia a kombinaci kadmia s keratinovým hydrolyzátem na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Příloha P IV: FTIR spektrum kořenů vegetativní části rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) pěstovaného ve stresových podmínkách kadmia a kadmia v přítomnosti keratinového hydrolyzátu v rozsahu  $4000\text{ cm}^{-1} - 600\text{ cm}^{-1}$

Příloha P V: FTIR spektrum kořenů vegetativní části rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) pěstovaného ve stresových podmínkách arsenu a arsenu v přítomnosti keratinového hydrolyzátu v rozsahu  $4000\text{ cm}^{-1} - 600\text{ cm}^{-1}$

**PŘÍLOHA P I: NAMĚŘENÉ A VYHODNOCENÉ PARAMETRY PŘI  
APLIKACI KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU NA RŮST  
JEČMENE SETÉHO (*HORDEUM VULGARE*)**

	Kontrola		c(keratinový hydrolyzát), mg/l							
Petriho miska	0		200		300		400		500	
	Délka kořene: min, cm / max, cm									
1	2,9	17,7	1,4	15,7	0,8	15,3	1,9	15,8	0,2	14,7
2	1,1	13,1	0,3	9,6	0,6	13,9	0,1	13,9	1,6	14,3
3	0,5	17,3	1,3	18,2	1,1	15,6	1,4	15,4	1,2	13,8
počet vyklíčených semen	29		28		25		28		27	
<i>PDKL</i> - průměrná délka klíčku, cm	8,6		9,8		10,7		10,8		10,7	
<i>PDKR</i> - průměrná délka kořene, cm	11,2		10,2		11,5		11,2		9,8	
<i>KL</i> - průměrná klíčivost, %	96		93		83		93		90	



**PŘÍLOHA P II: NAMĚŘENÉ A VYHODNOCENÉ PARAMETRY PŘI  
APLIKACI ARSENU A KOMBINACI ARSENU S KERATINOVÝM  
HYDROLYZÁTEM NA RŮST JEČMENE SETÉHO (*HORDEUM  
VULGARE*)**

Naměřené a vyhodnocené parametry při aplikaci arsenu na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Petriho miska	Kontrola		c(As), mg/l					
	0		5		10		20	
	Délka kořene: min, cm / max, cm							
1	2,4	10,8	0,7	10,8	0,4	3,1	0,2	3,2
2	0,9	11,3	0,5	13,2	0,2	2,8	0,8	2,6
3	0,6	14,4	1,2	8,8	0,3	2,9	0,7	4,4
počet vyklíčených semen	29		25		28		25	
<i>PDKL</i> - průměrná délka kličku, cm	8,1		6,3		3,9		3,0	
<i>PDKR</i> - průměrná délka kořene, cm	8,5		6,4		2,0		1,9	
<i>KL</i> - průměrná klíčivost, %	96		83		93		83	
<i>I</i> – inhibice růstu kořene, %	-		40,3		56,6		62,4	

Naměřené a vyhodnocené parametry při aplikaci arsenu v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Petriho miska	Kontrola		c(Hydr400+As), mg/l					
	0		5		10		20	
	Délka kořene: min, cm / max, cm							
1	2,4	10,8	0,6	14,8	0,3	12,4	0,9	11,1
2	0,9	11,3	1,0	12,2	0,7	13,3	1,2	10,2
3	0,6	14,4	1,5	13,4	0,7	15,1	1,1	8,2
počet vyklíčených semen	29		29		28		26	
<i>PDKL</i> - průměrná délka kličku, cm	8,1		7,6		8,2		5,4	
<i>PDKR</i> - průměrná délka kořene, cm	8,5		9,5		8,2		6,6	
<i>KL</i> - průměrná klíčivost, %	96		96		93		86	
<i>I</i> – inhibice růstu kořene, %	-		14,6		14,6		21,6	

**PŘÍLOHA P III: NAMĚŘENÉ A VYHODNOCENÉ PARAMETRY PŘI APLIKACI KADMIA A KOMBINACI KADMIA S KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM NA RŮST JEČMENE SETÉHO (*HORDEUM VULGARE*)**

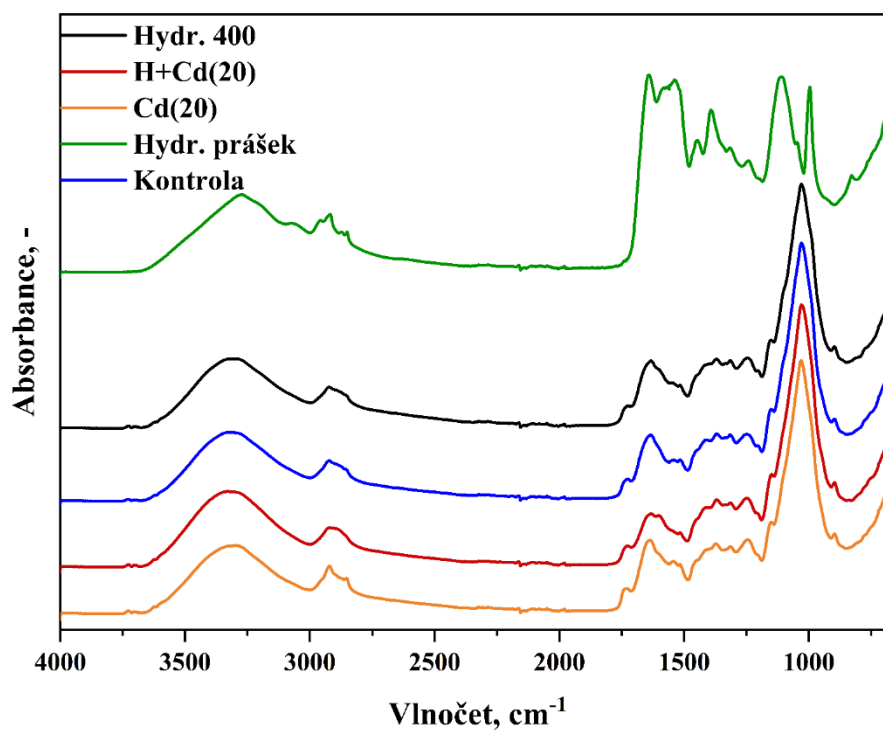
Naměřené a vyhodnocené parametry při aplikaci kadmia na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Petriho miska	Kontrola		c(Cd), mg/l					
	0		5		10		20	
	Délka kořene: min, cm / max, cm							
1	1,1	12,7	0,6	10,4	3,3	12,3	0,3	13,3
2	1,1	12,3	5,4	13,5	2,1	15,2	2,6	12,4
3	1,3	14,2	0,8	15,2	3,1	16,0	1,3	12,4
počet vyklíčených semen	29		27		27		27	
<i>PDKL</i> - průměrná délka klíčku, cm	8,9		8,1		9,2		8,7	
<i>PDKR</i> - průměrná délka kořene, cm	9,4		8,9		10,4		8,1	
<i>KL</i> - průměrná klíčivost, %	96		90		90		90	
<i>I</i> – inhibice růstu kořene, %	-		15,0		18,7		15,2	

Naměřené a vyhodnocené parametry při aplikaci kadmia v kombinaci s keratinovým hydrolyzátem na růst ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Petriho miska	Kontrola		c(Hydr400+Cd), mg/l					
	0		5		10		20	
	Délka kořene: min, cm / max, cm							
1	1,1	12,7	2,0	11,8	0,6	13,3	0,6	7,4
2	1,1	12,3	1,1	16,2	0,6	10,1	0,3	6,8
3	1,3	14,2	0,8	13,3	2,5	10,2	1,4	8,9
počet vyklíčených semen	29		29		29		30	
<i>PDKL</i> - průměrná délka kličku, cm	8,9		9,9		9,8		7,9	
<i>PDKR</i> - průměrná délka kořene, cm	9,4		11,6		8,4		5,2	
<i>KL</i> - průměrná klíčivost, %	96		96		96		100	
<i>I</i> – inhibice růstu kořene, %	-		-		6,8		-	

**PŘÍLOHA P IV: FTIR SPEKTRUM KOŘENŮ VEGETATIVNÍ ČÁSTI  
ROSTLINY JEČMENE SETÉHO (*HORDEUM VULGARE*)  
PĚSTOVANÉHO VE STRESOVÝCH PODMÍNKÁCH KADMIA A  
KADMIA V PŘÍTOMNOSTI KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU V  
ROZSAHU 4000  $\text{cm}^{-1}$  – 600  $\text{cm}^{-1}$**



**PŘÍLOHA P V: FTIR SPEKTRUM KOŘENŮ VEGETATIVNÍ ČÁSTI  
ROSTLINY JEČMENE SETÉHO (*HORDEUM VULGARE*)  
PĚSTOVANÉHO VE STRESOVÝCH PODMÍNKÁCH ARSENU A  
ARSENU V PŘÍTOMNOSTI KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU V  
ROZSAHU 4000  $\text{cm}^{-1}$  – 600  $\text{cm}^{-1}$**

